

# ***1. TARTALOMJEGYZÉK***

<b>1. TARTALOMJEGYZÉK</b>	<b>1</b>
<b>2. JELMAGYARÁZAT</b>	<b>3</b>
<b>3. BEVEZETÉS</b>	<b>4</b>
<b>4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>6</b>
4.1. ÉLET ANAEROB KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT	6
4.2. CLOSTRIDIUMOK	10
4.2.1. A CLOSTRIDIUMOK JELLEMZÉSE	10
4.2.2. A CLOSTRIDIUMOK FILOGENETIKAI LESZÁRMAZÁSA	14
4.2.3. A CLOSTRIDIUMOK ELŐFORDULÁSA ÉS SZEREPE TERMÉSZETES KÖRNYEZETEKBE	15
4.3. SZULFÁTREDUKÁLÓ PROKARIÓTÁK	16
4.3.1. A SZULFÁTREDUKÁLÓ PROKARIÓTÁK JELLEMZÉSE	16
4.3.2. A SRP FILOGENETIKAI LESZÁRMAZÁSA	20
4.3.3. A SRP ELŐFORDULÁSA ÉS SZEREPE KÜLÖNBÖZŐ KÖRNYEZETEKBE	21
4.4. A VIZSGÁLT TERMÉSZETES KÖRNYEZET	23
4.4.1. A VELENCEI-TÓ	23
4.4.2. A NÁD ÉS NÁDAS	25
4.4.3. A RIZOSZFÉRA, MINT MIKROBIÁLIS ÉLETTÉR	29
4.5. A BAKTÉRIUMOK DIVERZITÁSÁT VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK	32
<b>5. CÉLKITŰZÉSEK</b>	<b>40</b>
<b>6. ANYAG ÉS MÓDSZER</b>	<b>41</b>
6.1. MINTAVÉTEL	41
6.2. TENYÉSZTÉSEN ALAPULÓ VIZSGÁLATOK	42
6.2.1. CSÍRASZÁMBECSLÉS MOST-PROBABLE-NUMBER (MPN) TECHNIKÁVAL	42
6.2.2. A TENYÉSZTÉSBE VONHATÓ BAKTÉRIUMOK DÚSÍTÁSA	46
6.2.3. BAKTÉRIUMTÖRZSEK IZOLÁLÁSA	47
6.2.4. A CLOSTRIDIUM TÖRZSEK FENOTÍPUSOS JELLEMZÉSE	48
6.2.5. A SZULFÁTREDUKÁLÓ BAKTÉRIUM TÖRZSEK FENOTÍPUSOS JELLEMZÉSE	51
6.3. A TENYÉSZTETT TÖRZSEK VIZSGÁLATA MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL	55
6.3.1. GENOMIÁLIS DNS KINYERÉSE ÉS TISZTÍTÁSA BAKTÉRIUMTÖRZSEKBŐL	55
6.3.2. SPECIÁLIS DNS SZAKASZOK FELSZAPORÍTÁSA POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓVAL (PCR)	57
6.3.3. A PCR TERMÉKEK RFLP ANALÍZISE	60
6.3.4. A FELSZAPORÍTOTT DNS SZAKASZOK SZEKVENÁLÁSA	61

<b>6.4. SZULFÁTREDUKÁLÓ BAKTÉRIUMOK KIMUTATÁSA TENYÉSZTÉSTŐL FÜGGETLEN MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZERREL</b>	<b>63</b>
6.4.1. DNS IZOLÁLÁS A RIZOSZFÉRA MINTÁBÓL	63
6.4.2. A <i>DESULFOVIBRIO</i> – <i>DESULFOMICROBIUM</i> CSOPORT TAGJAINAK SPECIFIKUS KIMUTATÁSA DGGE SEGÍTSÉGÉVEL	64
6.4.3. SRB KIMUTATÁSA A KÖZÖSSÉGI DSRAB GÉN KÉSZLET KLÓNOZÁSÁVAL	71
<b>7. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK</b>	<b>74</b>
7.1. A TENYÉSZTÉSBE VONT CLOSTRIDIUMOK ÉS SZULFÁTREDUKÁLÓ BAKTÉRIUMOK CSÍRASZÁMÁNAK ALAKULÁSA A VELENCEI-TÓ ÜLEDÉKÉBEN ÉS A NÁD RIZOSZFÉRÁBAN	74
7.2. TENYÉSZTÉSBE VONT CLOSTRIDIUM FAJOK A VELENCEI-TAVI NÁDASOK RIZOSZFÉRÁJÁBAN	78
7.3. TENYÉSZTÉSBE VONT SZULFÁTREDUKÁLÓ BAKTÉRIUMOK A VELENCEI-TÓ NÁD RIZOSZFÉRÁJÁBAN	91
7.4. SZULFÁTREDUKÁLÓ BAKTÉRIUMOK KIMUTATÁSA TENYÉSZTÉSTŐL FÜGGETLEN MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZERREL	99
7.4.1. A <i>DESULFOVIBRIO</i> – <i>DESULFOMICROBIUM</i> CSOPORT TAGJAINAK KIMUTATÁSA DGGE SEGÍTSÉGÉVEL	99
7.4.2. SRB KIMUTATÁSA A KÖZÖSSÉGI DSRAB GÉN KÉSZLET KLÓNOZÁSÁVAL	105
<b>8. ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>110</b>
<b>9. KIVONAT</b>	<b>116</b>
<b>10. ABSTRACT</b>	<b>118</b>
<b>11. FELHASZNÁLT IRODALOM</b>	<b>119</b>
<b>12. FÜGGELÉK</b>	<b>135</b>
<b>13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>137</b>

## 2. JELMAGYARÁZAT

Általános rövidítések	
SRP	Sulphate-Reducing Prokaryotes
SRB	Sulphate-Reducing Bacteria
CFU	Colony forming unit
MPN	Most Probable Number
PCR	Polimerase Chain Reaction
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
16S-RFLP	16S rDNA RFLP
dsr-RFLP	<i>dsrAB</i> RFLP
DsrAB	Disszimilatorikus szulfid redukáz enzim $\alpha$ - és $\beta$ -alegység
DsrA	Disszimilatorikus szulfid redukáz enzim $\alpha$ -alegység
<i>dsrAB</i>	Disszimilatorikus szulfid redukáz enzim $\alpha$ - és $\beta$ -alegység együttes génjei
<i>dsrA</i>	Disszimilatorikus szulfid redukáz enzim $\alpha$ -alegység génje
CAT	Kataláz reakció
sp.	species
bp	bázispár
mtsai	munkatársai

Táptalajokkal kapcsolatos rövidítések	
PMB	Postgate's Medium B
RCM	Reinforced Clostridium Medium
RMAC	Reinforced Medium for Alkalophilic Clostridia

Az API20A teszt egyes szubsztrátjainak rövidítései	
IND	L-triptofán
URE	urea
GLU	D-glükóz
MAN	D-mannitol
LAC	D-laktóz
SAC	D-szacharóz
MAL	D-maltóz
SAL	szalicin
XYL	D-xilóz
ARA	L-arabinóz
GEL	zselatin
ESC	eszkulin
GLY	glicerin
CEL	D-cellobióz
MNE	D-mannóz
MLZ	D-melezitóz
RAF	D-raffinóz
SOR	D-szorbitol
RHA	D-ramnóz
TRE	D-trehalóz

### 3. BEVEZETÉS

A nád (*Phragmites australis* /Cav./ Trin et Steudel) Európa és Magyarország különböző tájainak flóraleíró munkáiban közönséges fajként szerepel. Nagy kiterjedésben megtalálható nagy tavaink (a Balaton, a Fertő, a Velencei-tó) és az alföldi szikes tavak parti régiójában. A tó és tágabb környezete életében a nádasok egyrészt víztisztító funkciójuk, másrészt trofikus kapcsolatokban játszott szerepük miatt nagyon jelentősek. E feladatok ellátásában a nádgyökérzet és a rizóma környezetében élő mikrobaközösségek is sokrétű szerepet játszanak. Nemcsak a nádas anyagforgalmában fontosak, hanem hatással vannak a nádnövény egészségi állapotára is, megismerésük ezért kiemelkedő jelentőséggel bír.

Az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén az 1990-es évek végén kezdődtek meg a velencei-tavi nádas állományok rizoszféra környezetének megismerését célzó mikrobiológiai kutatások, melyek elsősorban a nádnövénnyel kapcsolatban álló aerob baktériumközösségek faji összetételét és anyagcsere aktivitását vizsgálták. Az anaerob baktériumközösségek faji struktúrájára, a nádnövénnyel kialakított lehetséges szerepére vonatkozó ismereteink azonban meglehetősen szórványosak maradtak. Az anaerob baktériumközösségek tanulmányozása azért különösen indokolt, mivel a Velencei-tóhoz hasonló kisméretű, sekély tavakban az egyre fokozódó eutrofizáció révén felhalmozódott, gyakorta nagy mennyiségű szerves anyag lebontása az aerob heterotrófok fokozott oxigénigénye miatt az oxigénszint rohamos csökkenéséhez, majd anoxiához vezethet. Az autochton és allochton szerves anyagok, valamint antropogén szennyező anyagok átalakítása és lebontása ezután egyre nagyobb mértékben a kialakuló anaerob környezetekben történik. A folyamatokban résztvevő, eltérő anyagcserével rendelkező baktérium csoportoknak, valamint a közösség egészének tanulmányozása nemcsak a természetes ökoszisztéma megismerése és védelme szempontjából nélkülözhetetlen, hanem a mikrobaközösségekben rejlő biokémiai potenciál (anyag-transzformációs és mineralizációs képesség) feltérképezése szempontjából is, ami felvetheti a megismert mikroorganizmusok ipari és biotechnológiai célú felhasználásának lehetőségét. A rizoszféra asszociált növény és mikroorganizmus kapcsolatrendszerek esetében a teljes növény, illetve növényállományok alkalmazása is szóba jöhet például mesterséges szennyvíztisztító rendszerekben (mesterséges lápokban), amelyre az utóbbi időben egyre több példát találunk a nád esetében is. A nád környezetében élő anaerob mikroorganizmusok szerepére a múlt század kilencvenes éveitől kezdődően Európa szerte megfigyelt nádpusztulás is felhívta a figyelmet. Az anaerob mikroorganizmusok közül ugyanis a fermentáló szervezetek anyagcsere folyamataik révén nagy mennyiségben állítanak

elő kis szénatom számú szerves savakat, úgymint ecetsavat, propionsavat, vajsavat. Ezek a szerves savak bizonyos koncentrációk felett fitotoxikus hatást gyakorolhatnak többek között a nádnövényekre is. Nagy koncentrációban szintén fitotoxikus hatást válthatnak ki a szulfátredukáló baktériumok légzése során felszabaduló szulfid ionok is. Munkánk során ezért az anaerob mikroorganizmusok közül, a velencei-tavi nádasok rizoszférájában előforduló és a természetes tavi anaerob mineralizációs folyamatokban kulcsfontosságú két obligát anaerob baktériumcsoportnak, a fermentáló *Clostridium*oknak, és az elsősorban respiratórikus anyagcserét folytató szulfátredukáló baktériumoknak a tanulmányozását tűztük ki célul.

## **4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

### **4.1. ÉLET ANAEROB KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT**

Földünkön sok helyen és sokféle anoxikus élőhellyel találkozhatunk. Ezek gyakran kötődnek vizes környezetekhez, mivel az oxigén a vízben rosszul oldódik, és diffúzióval csak korlátozott mértékben képes terjedni. A vízfelszíntől számított bizonyos mélységben, a vízben élő szervezetek által termelt és felhasznált oxigén mennyiségétől is függően az oxigén koncentrációja jelentősen lecsökken. A legtöbb óceán és mélytenger víztestében teljesen anoxikus viszonyok nem alakulnak ki, a legtöbb esetben csak egy ún. oxigén minimum rétegről („oxygen minimum layer”) beszélhetünk. Ez azonban nem a tengerfenéken, hanem olyan köztes mélységekben (500-1000 m) alakul ki, ahová a fény már nem hatol le, de még viszonylag nagy számban jelen vannak aerob légző szervezetek. Ez alatt a víztestben már magasabb az oxigén koncentráció, a kevesebb fogyasztó élőlénynek, valamint a lehűlő és lesüllyedő felszíni vizekből érkező utánpótlásnak köszönhetően. A mérsékelt övi mély és rétegzett meromiktikus tavakat jellemző tavaszi és őszi cirkuláció mindig hiányos, azaz a teljes víztömeg nem vesz részt a felkeveredésben. Ennek következtében a legalsó sűrű vízréteg (hipolimnion) állandóan anoxikus marad (Hakala és mtsai, 2004). A tavi és tengeri üledékekben, a felhalmozódó szerves anyagok és a hozzájuk kapcsolódó intenzív aerob légzés következményeként, kialakul egy oxikus – anoxikus határfelület, ami alatt oxigén már gyakorlatilag nincs jelen. Azt, hogy ez az oxikus – anoxikus határfelület az üledéken belül milyen mélységben helyezkedik el, döntő részben a vizes környezet tápanyagellátottsága határozza meg. Nagy szerves anyag terheléssel jellemezhető eutróf tavak esetében ez az üledékfelszín alatt akár néhány milliméterrel is kialakulhat, a kiülepedett nagy mennyiségű szerves anyagot fogyasztó aerob heterotróf szervezetek (döntően prokarióták) fokozott oxigénigénye miatt. Kis szerves anyag tartalmú oligotróf tavak üledékében azonban nem ritka az üledékfelszíntől akár több centiméternyi mélységben kialakuló határfelület (Brune és mtsai, 2000). Anaerob mikrokörnyezetek talajokban is kialakulhatnak a talaj szerkezetétől (tömöttség, porózusság) és víztartalmától függően. Az oxikus – anoxikus határfelületek azonban nemcsak a talaj-, illetve üledékfelszínre merőlegesen jelentkezhetnek. A szárazföldi és vízi makrofitonok közül ugyanis azok, amelyek levegőztető szövetekkel (aerenchima) rendelkeznek, gyökérzetükön keresztül oxigént juttatnak környezetükbe, ezáltal a gyökerek felszínétől kiinduló oxigén gradiens jön létre. Ennek különösen a vízzel elárasztott talajokban, illetve a vízi üledékben gyökerező növények esetében van jelentősége (Hines és

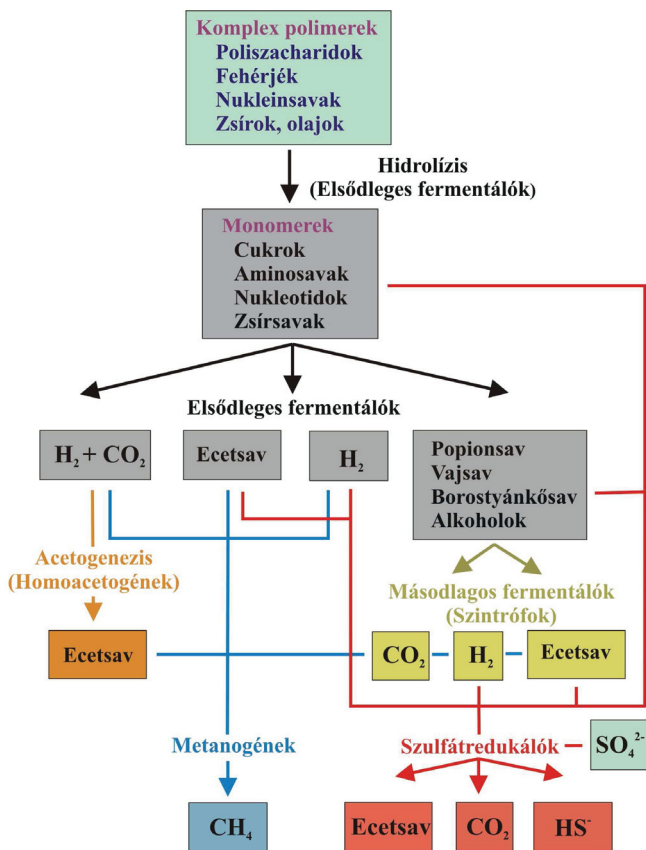
mtsai, 1999; Wind és mtsai, 1999). Speciális anaerob szakaszok jellemzik mindezek mellett a különböző alacsonyabb és magasabb rendű állatok emésztőrendszereit. Az állatokkal szimbiózisban élő anaerob mikroorganizmusok (pl. a kérődzők bendőjében található és az üvegházhatást fokozó metánt termelő ösbaktériumok) aktivitása a globális klímaváltozás szempontjából is számottevő (Johnson és Johnson, 1995).

Az anaerob körülmények közötti növekedés és szaporodás majdnem kizárólagosan prokarióta jellemzők. Az eukarióták többségében az anaerob energianyerés többnyire csupán átmeneti folyamat, amely az intenzív energiafelhasználás során, vagy egyéb okokból jelentkező hipoxiára adott válasza a sejteknek és a szervezetnek. A néhány ismert kivétel közé tartozik két csillós protozoa csoport (a bendőben élő holotrich és entodiniomorph csillósok), a mitokondriumot nem tartalmazó és ezáltal szigorúan vett anaerob életmódot folytató *Entamoeba*, *Diplomonas* és *Trichomonas* fajok, néhány fakultatív anaerob hengeresféreg (mint például az *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris vulpis*, *Trichinella spiralis*) és galandféreg, valamint a gombák közül sok *Mucor* faj, az *Aqualinderella fermentans* és a *Neocallimastix frontalis*.

Anaerob környezetekben a fentebb említett és más egyéb eukarióták száma meglepően nagy lehet, ennek ellenére részvételük az adott környezet anaerob lebontó folyamataiban nem túl számottevő. Ilyen természetes és mesterséges anaerob környezetekben a mineralizáció részben fermentációt, részben anaerob respiratórikus anyagcserét folytató (például nitráttal, szulfáttal, vagy szén-dioxiddal, mint terminális elektronakceptorral légző) mikroorganizmusok részvételével folyik.

A következőkben a szerves anyagok anaerob lebontását Madigan és mtsai (2000) alapján tekintjük át (1. ábra). Anaerob környezetekben a nagy molekulásúlyú összetett szerves polimerek (poliszacharidok, fehérjék, nukleinsavak) lebontását hidrolitikus enzimeket (pl. cellulázok, proteázok, nukleázok) termelő elsődleges fermentáló mikroorganizmusok (pl. *Clostridiumok*) kezdik meg. Az általuk termelt különféle hidroláz exoenzimekkel a polimereket alkotóelemeikre, monomerekre bontják, majd ezeket az egyszerűbb szerves vegyületeket (legnagyobb részt cukrok és aminosavak) változatos fermentációs utakon hasznosítják, aminek eredményeként különféle végtermékeket, mint például szerves savakat (ecetsav, propionsav, vajsav, borostyánkősav), alkoholokat, molekuláris hidrogént és szén-dioxidot választanak ki a környezetükbe. Ezt követően mind az első lépésben keletkező monomerek, mind az említett fermentációs végtermékek elektron donorok lehetnek különböző respiratórikus anyagcserét folytató anaerob mikroorganizmusok számára. Az egyes anaerob légzési típusok (vasredukció, nitrátredukció, fumarátredukció,

szulfátredukció, metanogenezis) megjelenése a rendelkezésre álló légzési elektron akceptorok (mint pl. Fe(III)-ionok, nitrát, fumarát, szulfát) mennyiségének a függvénye. Ez utóbbit döntően meghatározzák az adott élőhely adottságai és az abban jelen lévő mikroorganizmusok együttes anyagcsere aktivitásai. Az ezek eredményeként kialakuló redukált, illetve oxidált szerves és szervetlen vegyületek aránya az, ami kialakítja az adott környezetre jellemző redoxpotenciál értéket.



1. ábra. A szerves anyagok anaerob mineralizációjában részt vevő legfontosabb prokarióta csoportok közötti kapcsolatrendszerek  
(Az azonos folyamathoz tartozó mikrobiális átalakításokat, illetve az azt végző baktérium csoport nevét azonos színnel jelöltük.)



A szigorúan anaerob, alacsony redoxpotenciál értékekkel jellemezhető környezetekben a szerves anyagok terminális oxidációjában részt vevő két legfontosabb mikroorganizmus csoport a szulfátredukáló baktériumok és a metanogének. Közülük a szulfátredukáló baktériumok különböző fajai az elsődleges fermentációs végtermékek széles skáláját és ritkább esetekben még egyes cukrokat és aminosavakat is képesek hasznosítani elektron donorként a szulfát redukációjához. A metanogén baktériumok ezzel szemben sokkal szűkebb szénforrás, illetve elektron donor készlettel rendelkeznek, a metán előállításához az ecetsavon kívül csak bizonyos  $C_1$ -vegyületeket (mint a hangyasav, a metil-alkohol, a metil-aminok és metil-szulfidok), valamint hidrogént használnak elektron donorként. Ennek ellenére az acetátból, valamint a szén-dioxidból és hidrogénből kiinduló metanogenezis számos környezetben alapvető jelentőséggel bír a szerves anyagok végső lebontásában. Ehhez azonban a fermentációs végtermékeket a metanogének számára is hasznosítható vegyületekké kell alakítani. Ezt a feladatot látják el a másodlagos fermentáló, ún. szintróf baktériumok (pl. a *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas* és *Syntrophus* nemzetségek fajai), amelyek a már kisebb energiataralmú elsődleges fermentációs végtermékeket fermentálják tovább ecetsavvá, szén-dioxiddá és hidrogénné. Az így keletkező szubsztrátumok hasznosítása során a metanogének szerepe a folyamatban meghatározó, ugyanis metabolizmusuk a szintróf anyagcsere végtermékeinek (különösen a hidrogénnek) a környezetben kialakuló alacsony koncentrációját eredményezi, és ez teszi lehetővé, hogy a másodlagos fermentálók anyagcsere folyamata energia-felszabadulás mellett menjen végbe. A szulfátredukálók számos faja is képes azonban a fermentációs végtermékként megjelenő hidrogént és/vagy ecetsavat elektrondonorként hasznosítani. A szulfátredukáló baktériumok és a metanogének ezért a hidrogén és az acetát felhasználásában egymás kompetítorai. Hogy egy adott környezetben melyik csoport válik dominánssá, azt több tényező is meghatározhatja, de ezek közül az egyik legfontosabb a környezet szulfát koncentrációja. A tengeri környezeteket jellemző magas (27-28 mM, ~2,7 g/l) szulfát koncentrációknál a nagyobb energia nyereséggel járó szulfátredukció a domináns folyamat. Ennek köszönhetően a tengeri üledékekben a szulfátredukció a szerves anyagok mineralizációjának akár 50%-áért is felelős lehet (Jørgensen, 1982). Ezzel szemben a szulfátot jóval kisebb és éppen ezért limitáló (0,01-0,2 mM) mennyiségben tartalmazó édesvízi környezetekben, illetve szárazföldi talajokban a metanogenezis dominál (Holmer és Storkholm, 2001). Itt kell megemlítenünk, hogy a szulfátredukálók esetében anyagcseréjük szempontjából két alapvető csoportot különíthetünk el egymástól. A részlegesen oxidáló szulfátredukáló baktériumok (pl. *Desulfovibrio* és *Desulfobulbus* fajok) a szerves anyagokat csak acetátig képesek oxidálni és

az acetátot nem tudják a továbbiakban hasznosítani. Az acetát terminális oxidációjára, más egyéb szénforrások mellett, csak a teljesen oxidáló szulfátredukálók (pl. *Desulfobacterium* és *Desulfobacter* nemzetségek) képesek. Egy adott környezetben a részlegesen oxidáló szulfátredukálók által termelt acetát további hasznosítása a már említett dominanciaviszonyoktól függően vagy újabb szulfátredukció, vagy metanogenezis révén valósulhat meg. A helyzetet tovább bonyolítják az úgynevezett homoacetogén baktériumok (pl. *Acetoanaerobium*, *Acetobacterium*, *Acetogenium* nemzetségek fajai és sok *Clostridium* faj), amelyek energiatermelő anyagcseréje a Ljungdahl-Wood (másnéven acetyl-CoA) úton szén-dioxidból és hidrogénből kiinduló acetát szintézisen alapul. Ezáltal a homoacetogén baktériumok szintén kompetitorai lehetnek a fenti csoportoknak, energetikai megfontolások alapján azonban leginkább a metanogéneknek. Ilyen környezet például a kérődzők bendője, ahol az energetikailag kedvezőbb metanogenezis az egyeduralgó, de például a természetes emésztőrendszerében már számottevő szerephez jutnak a különböző homoacetogén fajok is (Breznak és mtsai, 1994). Ez utóbbi esetben a dominancia viszonyok alakulása már jóval nehezebben magyarázható, de lehetséges, hogy összefüggésben áll azzal, hogy a homoacetogén mikroorganizmusok kemoorganotróf módon is képesek növekedni különböző szénforrásokon és a természetes táplálkozása (lignines cellulóz), valamint az ebből kiinduló fermentációk kedvezőbb körülményeket teremtenek számukra, mint a kérődzők bendőjében.

## **4.2. CLOSTRIDIUMOK**

### **4.2.1. A CLOSTRIDIUMOK JELLEMZÉSE**

A *Clostridium* nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok a szerves anyagok anaerob lebontásában részt vevő elsődleges fermentáló szervezetek közé tartoznak. A nemzetség klasszikus, fenotípusos alapokon nyugvó definíciója szerint a *Clostridium* fajok Gram-pozitív, endospóra képző, obligát anaerob energetikai anyagcserét megvalósító mikroorganizmusok, amelyek nem képesek a szulfátot disszimilatórikus úton redukálni (Hippe és mtsai, 1992). A meghatározás alapján a nemzetség a mai napig több mint 150 érvényesen leírt fajt foglal magába. Az elmúlt 15 évben azonban a prokarióták osztályozása mélyreható változásokon ment át, legnagyobb részt a 16S rDNS szekvencia elemző módszerek általános elterjedése következtében. A *Clostridium* nemzetség taxonómiai definíciója a 16S rDNS alapú filogenetikai eredményekkel kiegészülve jelentősen szűkült, és számos korábbi *Clostridium* faj új nemzetségekbe került át.

A fenotípusos tulajdonságoknál maradva, a klasszikus definíció kritériumai alól is találni kivételeket az érvényesen leírt fajok között. Számos fajnál (pl. *C. aminovalericum*, *C. durum*, *C. formicaceticum*, *C. kluyveri*, *C. pasterianum*) csak nagyon fiatal tenyészeteknél észlelhető Gram-pozitív festődés, sőt egyes fajoknál (pl. *C. bryantii*, *C. magnum*, *C. papyrosolvens*, *C. polysaccharolyticum*) eddig csak Gram-negatív festődésű sejteket találtak, noha elektronmikroszkópos vizsgálatokban ezeknél a fajoknál is Gram-pozitív sejtfal struktúrát lehet megfigyelni (Cato és Stackebrandt, 1989).

A spóráképzés általánosan jellemző a *Clostridium* fajokra. Az endospórák alakja és elhelyezkedése a fajtól függően változatosan alakulhat. A legtöbb fajra a terminálisan elhelyezkedő kerek, vagy ovális spórák jellemzőek, amelyek a sejtek végét jelentősen deformálják, kiszélesítik (úgynevezett dobverő forma). Bizonyos fajokban, mint a *C. butyricum* és a *C. bifermentans* esetében azonban az anyasejtben szubterminálisan, vagy centrálisan elhelyezkedő és azt nem deformáló endospórák találhatók. A legtöbb faj sejttei egy endospórárt képeznek, néhányuk (*C. disporicum*, *C. oceanicum*, *C. lentocellum*) azonban kétspórás (Wiegel és mtsai, 2006). Az irodalomban a spóráképzés alól is találunk kivételeket. Egyes fajoknál (pl. *C. perfringens*, *C. ramosum*, *C. malenominatum*) az endospórák csak ritkán, vagy egyáltalán nem jellemzők. A spóráképzés elmaradásának több oka is lehet. Bizonyos esetekben (pl. *C. spiroforme*, *C. clostridioforme*) csak a frissen izolált tenyészetek sejttei nem képeznek spórákat, azonban megfelelő körülmények kialakításával (kevés és nehezen hasznosítható szénforrás, inkubálás az optimális növekedési hőmérséklet tartományon kívül) ki lehet váltani a spóráképzést (Cato és Stackebrandt, 1989). Az endospórák hiányát ugyanakkor okozhatja a sporulációhoz szükséges génekben bekövetkezett mutáció is, ahogy azt a *C. acetobutylicum* esetében már leírták (Meinecke és mtsai, 1984). A környezeti körülmények tehát befolyásolhatják az egyes fajok esetében a spórák kialakulását, ugyanakkor az endospórák magas hőmérséklettel és kiszáradással szembeni rezisztenciája is nagymértékben függhet az adott sejtek növekedési körülményeitől (a különbség különösen kifejezett lehet ugyanazon fajnál heterotróf, illetve autotróf módon növekedve), valamint a sporuláció alatti hőmérséklettől (Bryer és mtsai, 2000).

Bár a *Clostridium*ok energiaszerző anyagcseréje obligát anaerob körülmények között zajlik, az egyes fajok oxigénnel szembeni érzékenysége különböző. A magas oxigénszint és az ennek következtében a sejtekben felszaporodó reaktív oxigén gyökök és peroxidok miatt a vegetatív sejtek el is pusztulhatnak, a kifejlődött endospórák azonban megőrzik életképességüket. Több fajnál (pl. *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. intestinale*) megfigyelték, hogy oxigén jelenlétében felfüggesztik a növekedést, de az anaerob viszonyok

helyreállításával újra növekednek (Wiegel és mtsai, 2006). A *C. aerotolerans* esetében azonban a sejtek aerob inkubáció alatt is képesek növekedni, és nem rázatott tenyészetekben a tápközeg kezdeti magas redoxpotenciálját akár -120 mV alá is csökkenthetik (van Gylswyk és van der Toorn, 1987). Más fajoknak nagyobb az oxigénnel szembeni érzékenysége, de az alacsonyabb O<sub>2</sub> szinteket még tolerálják. A *C. haemolyticum* például 0,5 tf% O<sub>2</sub> koncentráció mellett még képes növekedni, sőt a *C. novyi* növekedés közben elvisel 3 tf% O<sub>2</sub>-szintet is (Loesche, 1969). Az oxigén káros hatásaival szembeni különböző mértékű rezisztencia hátterében a fajok nagy részében megtalálható szuperoxid-dizmutáz, kisebb részükénél a jelenlévő kataláz, peroxidáz és NADH-oxidáz enzimek, valamint különböző elektron akceptorként funkcionáló citokrómok és menakinonok állnak, amelyek mennyisége oxigén stressz hatására jelentősen megnőhet a sejtekben (Gregory és mtsai, 1978; Brioukhanov és mtsai, 2002).

A morfológiai karakterek sem mutatnak egyöntetűséget a nemzetségben belül. A legtöbb faj sejtjei egyenes vagy görbült pálcák, azonban a *C. spiroforme* és a *C. cocleatum* tenyészetjei spirális alakú sejteket tartalmaznak, a *C. coccoides* sejtjei pedig a kerek és az ovális között változnak. A legtöbb *Clostridium* faj sejtjei aktív mozgásra képesek, peritrich csillózáttal rendelkeznek, bár ez alól is találunk kivételeket (pl. *C. barkeri*, *C. cocleatum*, *C. innocuum*, *C. perfringens*, *C. ramosum* és *C. thermosaccharolyticum*) (Cato és Stackebrandt, 1989).

A legtöbb *Clostridium* faj képes különböző exoenzimek kiválasztására, amelyek sokféle makromolekula és polimer bontását katalizálják. A felszabaduló egyszerűbb szerves vegyületek, oligo- és monomerek ezután már hozzáférhetőek a sejtek lebontó anyagcsere folyamatai számára, amelyek különböző típusú fermentációk lehetnek. A *Clostridium*okból hiányoznak a megfelelő citokróm rendszerek, és ezáltal légzési elektron transzportozomhoz kötött oxidatív foszforilációra nem képesek. Az előnyben részesített szénforrások tekintetében a *Clostridium*okat négy csoportba sorolhatjuk. Vannak jellemzően szénhidrátokat hasznosító szacharolitikus, fehérjéket és aminosavakat értékesítő proteolitikus, valamint mindkét tápanyagforrást egyaránt felhasználni képes, továbbá egyiket sem értékesítő, más szénforrásokon növekedő, úgynevezett specialista szervezetek.

A szacharolitikus fajok között éppúgy megtaláljuk a jellemzően cellulózbontó fajokat (pl. *C. cellulovorans*, *C. cellulolyticum*, *C. papyrosolvens*), mint a keményítőbontókat (pl. *C. paraputrificum*, *C. roseum*, *C. thermosaccharolyticum*), illetve a pektint hasznosítókat (pl. *C. beijerinckii*, *C. puniceum*). Az egyes fajok azonban sokszor nem csak az egyik, hanem egyszerre több említett polimer lebontására és hasznosítására is képesek (Hippe és mtsai,

1992). Ezek közül növényi környezetekben kiemelt jelentőségű a cellulóz bontása. Ezt egy sejtfelszínhez kötődött multienzim-komplex végzi, ami celluloszómaként ismert. Változatos típusait tartalmazza a  $\beta$ -(1-4)-endoglukanázoknak, amelyek a cellulózt C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> cellulooligoszacharidokra (pl. cellobióz) szabadalják, amiket a celluloszóma más enzimkomponensei (cellobiohidroláz,  $\beta$ -glükózidáz) tovább hasítanak monoszacharidokká (Bayer és mtsai, 2000).

A *Clostridium*ok a monoszacharidok lebontására az Embden-Meyerhof-Parnas utat alkalmazzák, míg a savas funkciós csoportot tartalmazó cukrok (pl. glükonát) degradációját a módosult Entner-Doudoroff úton keresztül végzik. A lebontás során keletkező acetyl-CoA sorsa a kérdéses mikroorganizmus fajtól függően változhat. A fermentáció során általában etanol, ecetsav és/vagy vajsav elegyére konvertálódik. Ezek a fő fermentációs végtermékek, mindazonáltal más alacsony szénatomszámú szerves sav (propionsav, izovajsav, valériánsav, izovalériánsav, kapronsav) is keletkezhet fermentációjuk során (Andreesen és mtsai, 1989).

A proteolitikus fajokat proteáz exoenzimok termelése és fehérjék hidrolitikus bontása jellemzi. Sok patogén faj (pl. *C. botulinum*, *C. tetani*) is ebbe a csoportba tartozik. A fajok egy részénél (pl. *C. proteolyticum*, *C. tetani*) az aminosavak fermentációja során elágazó szénláncú zsírsavak keletkeznek (Andreesen és mtsai, 1989) és az aromás aminosavak vagy oxidatív dekarboxileződés, vagy az oldallánc levágása révén hasznosulnak (Elsden és mtsai, 1976). A fajok másik csoportjában (pl. *C. sporogenes*, *C. ghonii*) az aminosavak egy része különleges anyagcsere úton, az úgynevezett Stickland reakcióban hasznosul. Ennek során az aminosavak párokban fermentálódnak, ahol az egyik aminosav (pl. alanin, valin, leucin, izoleucin), mint hidrogén donor oxidálódik, a másik (pl. glicin, valin, prolin, arginin), mint hidrogén akceptor redukálódik (Nisman, 1954). A fermentáció végtermékei a kiindulási aminosavaktól függően különbözőek lehetnek. A *C. sporogenes* például az aromás aminosavakat a megfelelő aril-propionsavvá redukálja (Elsden és mtsai, 1976).

A nemzetség típusfaja, a *C. butyricum*, továbbá a *C. bifermentans* és a patogén *C. perfringens* a szacharo- és proteolitikus fajok körébe sorolható. Az anyagcsere folyamatok nemzetségen belüli változatosságát jelzi például az is, hogy míg a *C. butyricum* és *C. bifermentans* az aminosavak egy jelentős részét a Stickland reakcióban hasznosítja, addig a *C. perfringens*ben ez az út hiányzik (Hippe és mtsai, 1992).

Az úgynevezett specialista *Clostridium* fajok többnyire csak egy vagy néhány szénforrás fermentációjára képesek. A *C. acidurici* és a *C. purinolyticum* például purin származékokat (pl. urátok, adenin) hasznosít, a *C. kluyveri* pedig az etil-alkohol, ecetsav és hidrogén-karbonát vajsavvá, kapronsavvá és molekuláris hidrogénné történő fermentálására

specializálódott (Hippe és mtsai, 1992). A *C. propionicum* csak a treonint és három szénatomos vegyületeket (pl. tejsav, alanin, szerin, cisztein) fermentál legnagyobb részét propionsavvá (Janssen, 1991).

Eddig több mint 30 *Clostridium* fajt izoláltak humán klinikai mintákból. Többségük nem patogén, és általában a gasztro-intesztinális, a respiratórikus, a genitális rendszereken vagy a sebekben keresztül jutnak be a betegek szervezetébe, ahol opportunistaként csak a legyengült, immunszuppresszált szervezetben indukálnak fertőzőési folyamatot. A valóban patogén fajok között előfordulnak exotoxin termelők. A *C. botulinum* és a *C. tetani* pl. neurotoxint termel, előbbi a botulizmus, utóbbi a tetanusz okozója. A *C. perfringens*, és kisebb mértékben a *C. novyi* és a *C. septicum* gázgangrénával járó fertőzéseket okoznak, ami sebekben és nyílt törések után alakulhat ki (Smith, 1992).

#### 4.2.2. A CLOSTRIDIUMOK FILOGENETIKAI LESZÁRMAZÁSA

A klasszikus definíció szerinti *Clostridium* nemzetség filogenetikailag nem koherens csoport. A nemzetség filogenetikai heterogenitását az ide sorolt fajok genomi DNS-ének G+C mol% értékei is jól mutatják, ami 22 és 55 mol% között változik. Számos fajnál 28% körül van ez az érték, más kisebb klaszterek 35, 45 és 52% köré csoportosulnak. Az 1990-es évek végén megkezdődött 16S rRNS oligonukleotid katalógizálások alapján számos *Clostridium*ként leírt faj közelebbi rokonságban áll más endospórát nem képező fajokkal, mint a *Clostridium*okkal (Andreesen és mtsai. 1989).

A *Clostridium*ok a jelenleg érvényben lévő osztályozás szerint (Bergey's Taxonomic Outline, 2004; DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>) az alacsony G+C-tartalmú Gram-pozitív baktériumok 'Firmicutes' törzsébe (phylum), a Clostridia osztályba, a Clostridiales rendbe és azon belül a Clostridiaceae család *Clostridium* nemzetségébe tartoznak. Ez az osztályozás az összefoglaló referencia szakirodalom, a Bergey's Manual of Systematic Bacteriology második kiadásának megjelenésével párhuzamosan már a 16S rRNS gén szekvencia hasonlóságai (filogenetika) alapján igyekszik felépíteni a prokarióták rendszertanát. A fenti besorolás alapján a Clostridiaceae családba még további 23 nemzetség is tartozik (a teljesség igénye nélkül az *Acetovibrio*, *Alkaliphilus*, *Anaerobacter*, *Caloramator*, *Oxobacter*, *Sarcina*, *Natronincola*, *Tindallia*). Ma már egyre inkább látszik azonban, hogy az *Anaerobacter*, *Caloramator*, *Oxobacter*, *Sarcina* és *Thermobrachium* nemzetségeken kívül a többi nem tartozik a szigorúan vett Clostridiaceae család filogenetikai körébe, csupán azért kerülhettek ide, mert nagymérvű 16S rDNS hasonlóságot mutatnak a *Clostridium* nemzetség, korábban a fenotípusos taxonómia alapján besorolt, azonban

valójában tévesen klasszifikált tagjaival (Wiegel és mtsai, 2006). A számos 16S rDNS alapon nem valódi, de érvényesen leírt *Clostridium* faj eredményezi a tradicionális *Clostridium* nemzetségben feszülő jól ismert problémákat. Az első átfogó filogenetikai munka a *Clostridium* nemzetséghez kapcsolódóan Collins és mtsai (1994) nevéhez fűződik. Ez és az ezt követő összehasonlító elemzések (Stackebrandt és mtsai, 1999) rámutattak arra, hogy a *Clostridium* fajok több mint fele valójában nem közelrokon a nemzetség típusfajával, a *C. butyricum*mal, és ezért filogenetikailag nem is tartozhatna ebbe a nemzetségbe. Ilymódon a 2006. évben számon tartott 152 érvényesen leírt *Clostridium* fajból csak 73 sorolható a szigorúan vett *Clostridium* nemzetségbe, amit Collins és mtsai (1994) korábban, mint „cluster I”-et definiáltak. A maradék 89 faj az ezen kívül eső klaszterekbe sorolódott, és filogenetikai szempontból vagy más létező családok, vagy új családok tagjai lennének. Ebbe a körbe tartoznak például olyan jól ismert és jelentős *Clostridium* fajok, mint a *C. cellulolyticum*, *C. bifermentans*, *C. glycolicum*, *C. difficile*, *C. ghonii*, *C. hastiforme*, *C. celerecrescens* és a *C. propionicum*. Egy további a fenti kérdéskörhöz kapcsolódó probléma, hogy az összehasonlító szekvencia analízisek alapján más nemzetségek bizonyos fajai viszont valójában a szigorúan vett *Clostridium* nemzetségbe („cluster I”) tartoznak, úgymint az *Anaerobacter polyendosporus*, az *Eubacterium moniliforme* és az *Eubacterium tarantellae*, valamint a *Sarcina ventriculi* és a *Sarcina maxima*. Az *Eubacterium* fajok esetében a téves besorolás azon a megfigyelésen alapult, hogy a nevezett fajok nem képeznek endospórát. Az *Anaerobacter* faj esetében van spóráképzés, besorolása egyszerűen a 16S rDNS szekvencia analíziseket megelőző időben történt. A két *Sarcina* faj esetében már sokkal bonyolultabb a helyzet, mivel a *Sarcina* nemzetséget írták le korábban, és ezáltal taxonómiai értelemben prioritást élvez. Ugyanakkor tekintetbe véve számos *Clostridium* faj orvosi mikrobiológiai jelentőségét mindkét nemzetség megtarthatta az eredeti nevét (Wiegel és mtsai, 2006).

#### **4.2.3. A CLOSTRIDIUMOK ELŐFORDULÁSA ÉS SZEREPE TERMÉSZETES KÖRNYEZETEK BEN**

A spóráképzés képessége miatt *Clostridium* fajokat gyakorlatilag majdnem minden környezetből izolálhatunk, az antarktiszi jégtől a sivatagi homokvidékeken keresztül az alkalikus, vagy éppen savas hőforrások vizéig. Még a patogén fajok, mint a *C. tetani* is izolálhatók majdnem minden aerob talajmintából, vagy éppen a szálló porszemcsékről. Ez az oka többek között annak, hogy a kiterjedt immunizálások ellenére a tetanusz kórokozója máig is igen jelentős patogén faj.

Mindazonáltal nem szabad megelégednünk arról, hogy az endospórák természete miatt a *Clostridium* fajok izolálása egy adott környezetből nem feltétlenül jelenti azt, hogy az adott faj ugyanott növekedésre és szaporodásra is képes. Ebből a szempontból az oxigénnel szembeni érzékenység az egyik meghatározó tényező. Ahogy már beszámoltunk róla, sok *Clostridium* faj képes kivédeni az oxigén jelenlétét megfelelő elektron akceptor molekulák és enzimek koncentrációjának megnövelésével a sejtben, valamint azáltal, hogy leállítja anyagcsere folyamatait, és nem növekedik tovább. Ezek a mechanizmusok azonban inkább a túlélést szolgálják, mintsem az aerob életterek benépesítését. Mindamelllett segíthetik az adott fajt érvényesíteni alacsonyabb oxigén koncentrációjú környezetekben, mint amilyenek például a vízi növények rizoszférájában találhatók az aktív gyökérfelszíntől távolodva kialakuló oxigén gradiens mentén (Küsel és mtsai, 2001).

A *Clostridium* fajok által legnagyobb mértékben benépesített életterek azonban a talajokban és üledékekben az oxikus – anoxikus határfelületek elhagyása után kialakuló anaerob környezetek. Ilyen anaerob környezetek kialakulhatnak a tápanyagokban gazdag talajok és üledékek felsőbb rétegeiben is az aerob, illetve fakultatív anaerob szervezetek fokozott oxigénigénye révén (Hippe és mtsai, 1992). Nagy számban találhatunk még *Clostridium* fajokat az emlősök emésztőrendszerének anoxikus szakaszaiban (Varel és mtsai, 1984). Ezekben a folyamatos tápanyag ellátottságú környezetekben, beleértve a kérődzők bendőjét is, kisebb jelentőséggel bírnak, mint más nem spóráképző, anaerob fermentáló szervezetek, valószínűleg éppen a spóráképzésük, illetve annak energetikai többletköltsége miatt (Zamenhof és Eichhorn, 1967).

A *Clostridium*ok többsége mezofil szervezet, de találunk köztük pszichrofil és termofil, mérsékelten halofil, illetve mérsékelten acidofil, valamint alkalofil fajokat egyaránt (Wiegel és mtsai, 2006).

### **4.3. SZULFÁTREDUKÁLÓ PROKARIÓTÁK**

#### **4.3.1. A SZULFÁTREDUKÁLÓ PROKARIÓTÁK JELLEMZÉSE**

A szulfátredukáló prokarióták (SRP) morfológiai, fiziológiai és genomi tulajdonságaikat tekintve is rendkívül változatos mikroorganizmusok. Egyetlen közös jellemzőjük, hogy a szulfátot disszimilatórikus úton, azaz energiatermelő légzési elektrontranszportláncuk terminális elektron akceptoraként képesek redukálni. Ezt a folyamatot fontos megkülönböztetnünk a prokarióták és a növények között általánosan elterjedt asszimilatórikus szulfátredukációtól, melynek során a sejtek bioszintetikus

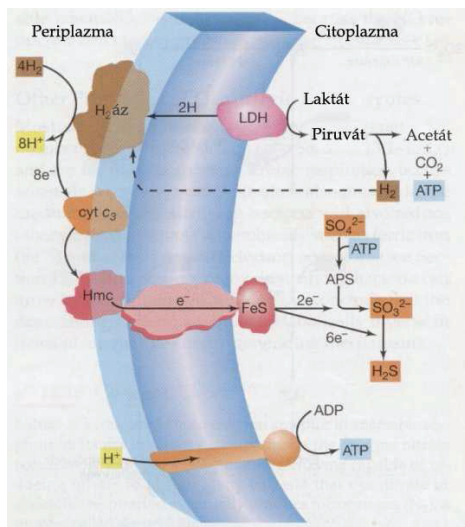


folymataik (pl. a cisztein szintézis) számára állítanak elő redukált kénvegyületeket energiaigényes lépések sorozatában. A szulfátredukáló prokarióták filogenetikailag polifiletikus származásúak, SRP fajok megtalálhatók az Archaea és Bacteria (korábban Eubacteria) doménekben egyaránt, ráadásul a Bacteria doménen belül is szerteágazóan. A SRP polifiletikus eredete ellenére a szulfátredukáló képességért felelős kulcsenzim, a disszimilatórikus szulfít reduktáz (DSR) feltehetően monofiletikus eredetű, és valószínűleg laterális géntranszfer segítségével terjedt el a filogenetikailag elkülönülő ágakat reprezentáló csoportok tagjai között (Klein et al., 2001). Mindezek tükrében a SRP lényegében fiziológiai alapon szerveződő csoportnak tekinthetők.

A SRP alapvetően anaerob respiratórikus anyagcserét folytatnak a szulfátnak, illetve a szulfát mellett fajtól függően más oxidált kénformáknak egészen szulfidig történő disszimilatórikus redukciójával. Az anaerob légzés számos változata közül a szulfátredukció az egyik legszembetűnőbb folyamat jellegzetes szagú és alapvetően toxikus végterméke, a kénhidrogén miatt. A kénhidrogén, illetve vizes közegben a különböző mértékben protonált szulfid ionok kémiaiilag különösen reaktívak (többek között különböző fémekkel, vastartalmú ásványi anyagokkal és az oxigénnel szemben is), ami által nagy hatással lehetnek az adott környezet kémiai viszonyaira. Toxicitásuk ellenére, a szulfid ionok nagy jelentőséggel bírnak számos más mikroorganizmus számára. Elektron donorként szolgálnak ugyanis különféle aerob kemotróf (pl. *Beggiatoa*, *Thiothrix* és *Thiobacillus* fajok) és anoxikus fototróf baktérium (pl. *Chlorobium*, *Chloroflexus* és *Chromatium*) energetikai anyagcseréjében. A különböző oxidációs állapotú kénformák mikrobiális redukciós és oxidációs átalakulásai a lokális kénkörforgalom alapvető mozgó mechanizmusai. Mivel a bioszférában a szulfát a termodinamikailag legstabilabb és a legnagyobb mennyiségben jelenlévő kénforma, a SRB által megvalósított szulfátredukció képezi az alapját a különböző biológiai kénkörforgalmi rendszereknek (Jørgensen, 1987).

A szulfátredukció folyamatában alapvetően 3 enzim vesz részt. Mivel a szulfát ionok termodinamikailag különösen stabilak az első lépésben az ATP-szulfuriláz enzim egy ATP molekula hozzákötésével aktiválja azokat. Az így létrejött adenosin-5'-foszfoszulfátot (APS) az APS-reduktáz 2 elektron átmenettel járó lépésben szulfít ionná ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) redukálja. Ezt követően a szulfít ionok 6 elektron átmenettel járó redukcióját szulfid ionokká ( $\text{S}^{2-}$ ) a folyamat kulcsenzime, a disszimilatórikus szulfít reduktáz katalizálja (Madigan és mtsai, 2000). A szulfát redukciójához szükséges elektrondonorok az egyes nemzetségek és fajok szerint sokfélék lehetnek. Az egyik általános, majdnem minden szulfátredukáló baktérium által hasznosított elektron donor a tejsav (laktát). A tejsavon kívül elektron donorként

szolgálhatnak még egyéb karbonsavak (pl. ecetsav, piroszölősav, propionsav, nagy szénatomszámú zsírsavak), aromás vegyületek (pl. benzolsav, indol), alkoholok (etil-alkohol, propil-alkohol, propándiolok), vagy akár a molekuláris hidrogén is (Widdel, 1992; Widdel és Bak, 1992; Madigan és mtsai, 2000). A disszimilatórikus szulfátredukció folyamatát a tejsav példáján, leegyszerűsítve a 2. ábrán tekinthetjük át.



2. ábra. A disszimilatórikus szulfátredukcióhoz kapcsolódó membránkött elektrontranszport folyamatok és citoplazmatikus enzimek egyszerűsített ábrázolása (Madigan és mtsai (2000) alapján; magyarázat a szövegben.)

A vázolt folyamatban terminális elektron akceptor a szulfáton kívül fajtól függően még más oxidált kénvegyület is lehet, mint például a szulfít és a tiosulfát ( $S_2O_3^{2-}$ ). Egyes fajok képesek az elemi kén ( $S^0$ ) redukálására is (Widdel és Bak, 1992). Elektron akceptorok azonban nem csak kénvegyületek lehetnek. Néhány *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus* és *Desulfotomaculum* faj képes a nitrátot nitritté, majd ammóniává (Moura és mtsai, 1997), egyes *Desulfotomaculum* fajok pedig a  $Fe(III)$  ionokat  $Fe(II)$ -vé redukálni disszimilatórikus úton (Widdel, 1992). Egy különleges anyagcsereút a *Desulfovibrio sulfodismutans* által végzett diszproporció, ami formailag anorganikus fermentációnak felel meg (Bak és Pfennig, 1987). Ennek során a baktérium tiosulfátot, szulfítot vagy elemi ként alakít át részben szulfiddá és részben szulfáttá.

Bár a szulfátredukáló mikroorganizmusokat korábban szigorúan anaeroboknak gondolták, egyre több kutatás számol be arról, hogy sok *Desulfovibrio* faj nem csak a toxikusnak vélt oxigénformákat képes vízzé redukálni, de az oxigént légzési láncukba is be tudják kapcsolni, és eközben ATP-t szintetizálnak. Az aerob légzés, bár jóval nyereségesebb, mégis alapvetően csak védekező funkciót tölt be, mert a SRP fő elektron donorai az anaerob környezetekben találhatók. Mindazonáltal oxigén stressz idején a sejtekbe jutó oxigén egy részét ellélegezve csökkentik a reaktív oxigén gyökök kialakulásának esélyét (Dilling és Cypionka, 1990; Dannenberg és mtsai, 1992, Cypionka, 2000). A szulfátredukálók többi nemzetségébe tartozó szervezetek nem képesek a toxikus oxigén koncentráció ilyen módon történő eliminálására, de egyes fajaik sejtaggregátumok képzésével, vagy az oxigén koncentrációval szembeni migrációval, illetve sejtlejtek szuperoxid-dizmutáz és/vagy kataláz enzimeinek segítségével bizonyos mértékben ki tudják védeni a megemelkedő oxigén koncentrációt (Dolla és mtsai, 2006).

A szénforrások hasznosításának tekintetében a SRP alapvetően kemoorganotróf-heterotróf szervezetek, néhány faj (pl. *Desulfotomaculum orientis*, *Desulfobacter hydrogenophylus* és *Desulfobacterium autotrophicum*) azonban fakultatív kemolitotróf-autotróf életmódot is képes folytatni, ekkor a szulfát energiatermelő redukciója a molekuláris hidrogén oxidációjával kapcsolódik, és a sejtek felépítéséhez szükséges szén a szén-dioxid asszimilációja révén épül be. A szén-dioxid asszimilációja a redukzív citrátkör (*Desulfobacter hydrogenophylus*), vagy a fajok többségénél (pl. a *Desulfotomaculum orientis* és *Desulfobacterium autotrophicum* esetében is) a redukzív acetyl-CoA út alkalmazásával valósul meg (Brysch és mtsai, 1987).

Kemoorganotróf módon növe, a szerves elektron donor sorsa alapján a SRP két csoportra oszthatók. A részleges oxidálók, mint a *Desulfovibrio*, a *Desulfotomaculum* és a *Desulfobulbus* fajok többsége a szerves anyagokat csak acetáig képesek oxidálni, nem található meg náluk a citromsav ciklus, vagy más az acetát hasznosítását lehetővé tevő anyagcsereút (pl. acetyl-CoA út). A teljes oxidálók, mint például a *Desulfobacter* és *Desulfosarcina* fajok, képesek a szerves vegyületeket (köztük az acetátot is) teljesen széndioxiddá oxidálni. Az acetát oxidációja kevesebb energiatermeléssel jár ugyan, de a SRP számára lehetővé teszi, hogy az anaerob lebontási folyamatok terminális lépéseiben is részt vegyenek.

A szulfátredukálók között fellelhető további metabolikus jellemvonások közül mindenképpen említésre érdemes, hogy többségük képes fermentatív úton is energiát előállítani (Rabus és mtsai, 2006), sok közülük nitrogént is fixál (Nazina és mtsai, 1979).

Egyes fajoknál kimutatták a klórozott aromás, illetve alifás vegyületek reduktív dehalogénezését is (DeWeerd és mtsai, 1990), valamint először náluk írták le a hosszú egyenes szénláncú (C13-C18) szénhidrogének szigorúan anaerob körülmények között megvalósuló lebontását (Aeckersberg és mtsai, 1998).

Mivel a SRP elsősorban fiziológiai csoportot képeznek, az ide tartozó mikroorganizmusok morfológiailag rendkívül változatosak. Találunk közöttük egyenes (pl. *Desulfobacter*) és görbült pálcákat (pl. *Desulfovibrio*), kokuszokat (pl. *Desulfococcus*), illetve csoportokba rendeződött sejteket (*Desulfosarcina*). A pálcá alakúak közül többen monotrich vagy lofotrich csillókkal mozognak, a *Desulfonema* fajoknál viszont egy különleges csúszó-sikló helyváltoztató mozgást (úgynevezett „gliding” mechanizmus) találunk.

#### 4.3.2. A SRP FILOGENETIKAI LESZÁRMAZÁSA

A szulfátredukció a prokarióták körében ősi, evolúciósan sikeres anyagszerűt. A folyamat ősi jellegét molekuláris genetikai (Wagner, 1998) és geokémiai kutatások egyaránt igazolták (Shen, 2001). Ez utóbbi izotópos vizsgálatok alapján a mikrobiológiai szulfátredukcióra utaló nyomok több mint 3 milliárd évesek. Az azóta eltelt időben a szulfátredukáló prokarióták a 16S rDNS alapú törzsfá alább felsorolt nagyobb ágain szóródtak szét (Castro és mtsai, 2000).

A SRP többsége a delta-Proteobaktériumokhoz tartozik. Jelenleg az itt található számos nemzetség közel 100 érvényesen leírt fajt foglal magába. A delta-Proteobaktériumokon belül a szulfátredukálók főleg a *Desulfovibrionales* és *Desulfobacterales* rendekbe és az azokon belül elhelyezkedő családokba tartoznak. Néhány nemzetség azonban a *Syntrophobacterales* rend *Syntrophobacteraceae* családjának a tagja (pl. *Desulforhabdus*, *Desulfacinum*). Az ezeken kívül eső rendekbe és családokba tartozó fajok például a kénredukáló *Desulfurella*, *Desulfuromosa* és *Desulfuromonas*, a vasredukáló *Pelobacter* és *Geobacter*, az aerob *Bdellovibrio* és *Myxococcus*, valamint a szintróf *Syntrophobacter* és *Syntrophus* nemzetségek tagjai. A *Desulfovibrionales* renden belül a *Desulfovibrionaceae* (*Desulfovibrio* fajok), a *Desulfomicrobiaceae* (*Desulfomicrobium*), *Desulfobalobiaceae* (pl. *Desulfobalobium*, *Desulfonatronovibrio*) és *Desulfonatronumaceae* (*Desulfonatronum*) családokat, míg a *Desulfobacterales* renden belül a *Desulfobacteraceae* (pl. *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*) és *Desulfobulbaceae* (pl. *Desulfobulbus*, *Desulforhopalus*) családokat találhatjuk. A két termofil nemzetség (*Thermodesulforhabdus* és *Desulfacinum*, *Syntrophobacteraceae*) kivételével a delta-

Proteobaktérium SRP többi tagja mind mezofil, vagy néhány esetben pszichrofil (pl. *Desulfofrigus*, *Desulfobaba*) (Knoblauch és mtsai, 1999).

A SRP második legnagyobb csoportja az alacsony G+C-tartalmú Gram-pozitív spóráképző nemzetségekbe (*Desulfotomaculum* és *Desulfosporosinus*) tartozik a Firmicutes Peptococcaceae családján belül. Egyik fajuk, a *Desulfotomaculum guttoideum*, valószínűleg tévesen ide sorolt tagja a Clostridiaceae családnak (Stackebrandt és mtsai, 1997), átsorolása azonban még nem történt meg.

A Bacteria doménen belül még két további törzsben (phylum) találunk szulfátredukálókat. Az egyik idetartozó nemzetség a *Thermodesulfovibrio* a Nitrospira, a másik a *Thermodesulfobacterium* a törzsfá mélyen elágazó Thermodesulfobacteria phylumában. Mindkét nemzetség termofil fajokat tartalmaz, melyeknek optimális növekedési hőmérséklete 65 és 70°C között van, de alacsonyabb hőmérsékleteken is képesek túlélni. A két nemzetség alapvető fiziológiai és fenotipikai karaktereik tekintetében hasonlít egymásra, de eltér a sejtalk (vibrio, illetve pálca) és a DNS G+C tartalma (30 illetve 34 mol%) tekintetében.

Végül a disszimilatórikus szulfátredukció képességét megtaláljuk az Archea doménen belül is. Az Euryarcheota Archaeoglobales rend egyetlen ide tartozó nemzetsége az *Archaeoglobus*. A csoport tagjai mind hipertermofilek 75-85°C fölötti optimális növekedési hőmérséklettel.

#### **4.3.3. A SRP ELŐFORDULÁSA ÉS SZEREPE KÜLÖNBÖZŐ KÖRNYEZETEKBE**

A SRP közül a Bacteria és Archea domén termofil fajai szárazföldi és mélytengeri hőforrásokból kerültek elő, ahol nagyon változatos és a különböző kénformák közösségi metabolizmusán alapuló baktériumközösségek alakulhatnak ki (Nakagawa és mtsai, 2004; Dillon és mtsai, 2007). A fajok döntő többségét kitevő mezofil, illetve kisebb számban pszichrofil fajok mind a Bacteria doménen belül helyezkednek el, ezért indokoltnak látjuk az ebbe a doménbe tartozó fajokat, mint szulfátredukáló baktériumok (SRB) elkülöníteni a továbbiakban.

A SRB gyakran és nagy számban fordulnak elő a tengerek (Jorgensen, 1982; Devereux és Mundfrom, 1994), brakkvízi torkolatok (Boschker és mtsai, 2001) és tavak üledékében (Sass és mtsai, 1998; Holmer és Storkholm, 2001), valamint rétegzett mély tavak anaerob víztestében (Tonolla és mtsai, 2000), illetve talajokban (Stubner, 2004). Mindemellett fontos szerepet játszanak a rizs (Wind és Conrad, 1997; Wind és mtsai, 1999), a tengeri (Hines és mtsai, 1999; Cifuentes és mtsai, 2003) és az édesvízi (Acha és mtsai,

2005) makrofítonok rizoszférajában is. A fenti környezetekben a SRB a legnagyobb számban és aktivitással az oxikus-anoxikus határfelületek anoxikus oldalán fordulnak elő, ahol a szulfid ionok gyorsan visszaoxidálódnak, és így magasabb a szulfát koncentrációja (Jorgensen, 1982; Sass és mtsai, 1997).

A szulfátredukáló baktériumok eukarióta szervezetekkel is képesek szoros kapcsolatokat kialakítani. Képviselőiket izolálták már a természetes emésztőrendszeréből (Breznak és mtsai, 1994) és a kérődzők bendőjéből (Coleman, 1960), ahol metanogén és homoacetogén baktériumok kompetitorai. Humán vonatkozásban nem túl jelentősek, ennek ellenére előfordulásukat az emberi emésztőrendszerben (Gibson és mtsai, 1991) és a szájüregben is (Langendijk és mtsai, 2001) leírták. Ez utóbbi irodalmak tanúsága szerint néhány szulfátredukáló baktérium akár opportunista patogén is lehet.

A SRB mind számukban, mind anyagszere aktivitásukban fontos szerepet játszhatnak a felületekre tapadt biofilmek felépítésében is (Amann és mtsai, 1992; Santegoeds és mtsai, 1998). A biofilm egy fajösszetételét és szerkezetét tekintve jól definiálható mikrobiális bevonat vízi környezetekben lévő élő és élettelen felületeken. Kialakulásának lényeges eleme, hogy a szilárd felületeken szerves anyagok adszorbeálódnak, még oligotróf feltételek között is. Inert felületek betelepülésekor elsősorban az így kialakuló kondicionáló film és a baktériumok extracelluláris poliszacharidjai között jön létre kölcsönhatás, majd ezt követően a baktériumok szaporodása révén kialakuló mikrokolóniákhoz újabb és újabb baktériumok kapcsolódhatnak (Costerton és Lapin-Scott, 1995). A biofilm fejlődésének előrehaladtával többek között tápanyagokra, pH-ra, oxigénre nézve diffúzió-függő kémiai és fizikai gradiensek alakulnak ki. Santegoeds és mtsai (1998) mikroelektródás mérésekkel bizonyították, hogy anaerob zóna már a biofilm fejlődésének első hetében kialakul, mivel az oxigén koncentrációja már a felső 200-400 µm-en nullára csökken. Hibridizációs analízissel kimutatták, hogy az általuk vizsgált szennyvíztisztító biofilmben a *Desulfobulbus* és *Desulfovibrio* fajok voltak a domináns szulfátredukáló baktériumok.

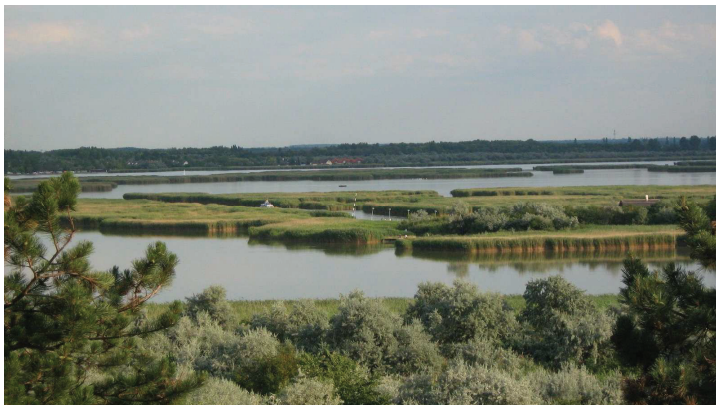
Ipari alkalmazásokban szintén fontos, gyakran káros szerep jut a SRB-nak. Szennyvíztisztítókból gyakran nagy a szulfát-tartalom, így a biofilmekben a végső lebontás akár 50%-áért is a szulfát-redukció lehet felelős (Ito és mtsai, 2002). A SRB toxikus kénhidrogént termelnek, és elősegítik a fémek korrózióját. A nagy nehézfémtartalmú bányászati és szennyvizek megtisztításában ugyanakkor éppen szulfidtermelésük révén játszanak fontos szerepet. A szulfid ugyanis rosszul oldódó csapadékot képez a réz, a cink, az arzén, a nikkel és a vas ionokkal, így az eredeti oldott-ion koncentráció akár 10-20%-ra is csökkenhet (Tony és mtsai, 2003). A köolajiparban a SRB által termelt szulfid-ionok szintén könnyen

csapadékot képeznek fémionokkal (pl. FeS), és ezáltal eltömíthetik a gáz-, illetve köolajvezetékek csöveit, valamint szennyezhetik a szállított szénhidrogéneket. Ezenkívül a SRB katódos depolarizáció révén katalizálhatják a vas korrózióját is. A katódon keletkező hidrogént a SRB hidrogenáz aktivitásuk révén eltávolítják a rendszerből, ezáltal az egyensúlyi folyamatot a fém oldódásának irányába tolják el, amit tovább segítenek az oldott fémionok csapadékbá vitelével is (Cord-Ruwisch és mtsai, 1987).

## ***4.4. A VIZSGÁLT TERMÉSZETES KÖRNYEZET***

### **4.4.1. A VELENCEI-TÓ**

A Velencei-tó Magyarország második legnagyobb szikes tava, területe kb. 24,5 km<sup>2</sup>. Korát 10-12 ezer évre becsülik. Mai alakja a századforduló tájékán a Nádas-tó lecsapolásával alakult ki (1. kép). A szélsőséges vízjárású, lápi és szikes jelleget is magán viselő sekély tó az idők során természetes úton eutrofizálódott, aminek eredményeképpen medre eliszaposodott, elmocsarasodott, és vízfelületének 60%-át nád borította. Ezt követte a tó egy részének üdülő tóvá, másik részének természetvédelmi területté való átalakítása. Ekkor került sor az üdülőövezeti részen a tó jelentős nád- és hinárirtással együttjáró partszabályozására és a mederrendezésen keresztüli vízszintszabályozására. (Reskóné, 1999; Reskóné és mtsai, 2001).



1. kép. A Velencei-tó látképe

A mederkotrás és a nádasirtás következtében a természetes úton megindult eutrofizáció fokozódott, és romlott a vízminőség is, hiszen a megfogyatkozott partmenti nádas-öv nem tudta ellátni természetes víztisztító funkcióját (Reskóné és mtsai, 2001).

A tóra az átalakításokat megelőzően egymástól kiterjedt nádasállományokkal elzárt belső tisztások jelenléte volt jellemző, melyek között gyakorlatilag nem volt vízcsera. Az így kialakult tisztásokat sajátos, egyedi vízminőség jellemezte, mozaikossá téve a tavat. Míg délnyugati részén huminanyagokban gazdag, kevés lebegőanyagot tartalmazó, fenékgig átlátszó barna vizek, addig a tó középső részén a hullámlás miatt gyakran felkeveredő, az üledéktől kevésbé átlátszó szürke vizek voltak jellemzők. Az északkeleti területek vize az algák tömeges elszaporodása miatt zöld színű volt (Buckó és Schmidt, 1995).

A nádasállományok felszámolásával, az üledék kotrásával a tisztásokat egymással közlekedővé tették, ami az egyes vizek közti éles határvonalak megszűnését eredményezte. Ezt támasztják alá a nád perifitonon végzett algológiai vizsgálatok is (Ács és mtsai, 1994; Buczkó és Ács, 1998; Ács és mtsai, 2003), melyek szerint a tó különböző pontjairól származó bevonatok fajösszetétele és dominancia-viszonyai igen hasonlóvá váltak.

A Velencei-tó jelenleg két, jól elkülöníthető térséggel rendelkezik (3. ábra). Az egyik a nyugati medence nádas-mocsaras Madárrezervátum Természetvédelmi Területe, itt találhatók az úszólápok is. Ez a biológiai szűrőként is működő terület három, vízminőségileg különböző területre osztható: I. a Császár-torkolat, a Kúti-csapás, a Német-tisztás és a Német-öböl; II. a Fekete víz, a Felsőéri- és az Alsóéri-tisztás, a Dinnyés-Kajtor csatorna; III. a Lángi-tisztás, a Vendel-tisztás és a Nagy-tisztás térsége. Az első terület az oxigénben legszegényebb, de egyben a legalacsonyabb pH-jú is, mivel legközelebb esik a vízgőyítő befolyásához. A második terület a Császár-víztől délre esik, sötét, alkalikusabb vízü. Mivel a kifolyás irányában helyezkedik el, vízének minőségét erősen befolyásolja a Hosszú-tisztás vize, bár sötét vizes jellegén nem változtat. A harmadik terület átmenet a lápi és a nyílt vizek között, barna vizes tartomány, jó oxigénháztartással és magas fajlagos vezetőképesség és pH értékekkel (Reskóné és mtsai, 2001).

A tó másik, a teljes felület közel kétharmadát érintő, keletre eső térsége a rekonstrukciót követően vált nagy nyíltvízű területekkel jellemezhetővé. Itt a tó egyik legnagyobb turisztikai értéke a sportolás, pihenés, horgászás és a fürdőzés. A tó keleti medencéjében található a másik befolyó, a Vereb-Pázmándi vízfolyás, mely a kialakított szűrőmező ellenére is jelentős terhelést jelent a Fürdetőre, így ez a Velencei-tó leginkább eutróf medencéje.



A fent említett negatív folyamatok hatását tovább súlyosbította az 1980-as évek végén, 1990-es évek elején jelentkező száraz, aszályos periódus. Következésképpen a tó vízszintje lecsökkent, vize betöményedett, az eutrofizálódási folyamatok felgyorsultak. Komoly problémát jelentett a *Microcystis aeruginosa* toxintermelő kékalgá és a *Cladophora glomeratus* zöldalga tömeges elszaporodása is. A nádasszegély körül felhalmozódó alगतömeg a nádasállomány súlyos károsodásához vezetett. A nádpusztulás elsősorban a keleti medence nádasaiban jelentkezett. A csapadékhány felerősítette a munkálatok utóhatásaként jelentkező erőteljes szikesedési folyamatot, a tó lápi jellege csökkent. A vízhiány miatt erősen károsodott élővilágot és lényegében magát a kiszáradásnak indult tavat is csak mesterséges vízpótlással lehetett megmenteni. A mesterséges vízpótlás és a vízszint természetes rendeződése az utóbbi évek időjárásának hatására a Velencei-tó vízminőségét és biológiai állapotát kedvező irányban változtatta meg (Reskóné és mtsai, 2001).

A tavat a kifejezetten lápos területek kivételével (az előző fejezet szerinti I és II vízminőségi csoportok) az oldott sók nagy koncentrációja miatt magas fajlagos vezetőképesség (3000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  körüli érték) jellemzi. Az uralkodó ionok a nátrium, magnézium, szulfát és hidrogén-karbonát, a pH jellemző értéke a tó szikes területén 8,8-9,0. A szulfátredukáló mikroorganizmusok szempontjából egyik legfontosabb paraméter, a szulfát ionok koncentrációja az egész tóban magasnak mondható, átlagosan 500 és 900 mg/l (~5-9 mM) közötti érték (Reskóné, 2005). Ez ugyan alatta marad a tengervízre jellemző értéknek (27-28 mM), de jóval magasabb az édesvizek esetében mért legnagyobb értékeknél (~0,2 mM). Ennek megfelelően a tó üledékében Reskóné és mtsai (2003) minden vizsgálati ponton intenzív szulfátredukációs aktivitást detektáltak.

#### 4.4.2. A NÁD ÉS NÁDAS

A nád (*Phragmites australis* /Cav./ Trin et Steudel) az egész Földön elterjedt, a pázsitfűfélék (Graminaceae) családjába tartozó fásodó gyöktörzsrű kozmopolita növény (den Hartog és mtsai, 1989). Gyakran sűrű, csaknem monospecifikus állományokat képez tavak litorális zónájában, folyók és csatornák mentén, továbbá sekély mocsaras és lápi területeken. Földrajzi elterjedése a hideg mérsékelt övi területektől a trópusokig terjed (Brix, 1999). A nád klonális növény, rizómái révén vegetatív szaporodásra is képes, ezáltal az új egyedek összeköttetésben maradnak az anyanövénnyel. Magról való szaporodása ritka. A legnagyobb *Phragmites* dominanciával jellemezhető ökoszisztémák Európában találhatók, melyek közt a Duna-delta mellett a Magyarország és Ausztria határán fekvő Fertő, illetve a Velencei-tó is kiemelkedő jelentőséggel bír. A nád genetikai variabilitását mindezidáig leginkább a

ploiditás-szint vonatkozásában vizsgálták. Ennek alapján a tetra- és oktoploid változatok bizonyultak a leggyakoribbaknak. Földrajzi elkülönülésük tekintetében a tetraploid változatok elsősorban Európában és Észak-Amerikában terjedtek el, Ázsiát és Ausztráliát pedig az oktoploid változatok jellemzik. Ettől függetlenül területi szinten kialakulhat együttélés a kétféle genetikai típus között, de hibridképződés általában nem történik. A fenti két típus mellett ritkábban triploid és hexaploid állományok is előfordulnak, amelyek valószínűleg egy régebbi keveredés eredményei (Clevering és Lissner, 1999).

A különböző ploiditású nádasállományok között a kontinentális dominancián túl különbségek lehetnek ökológiai szerepükben is. Egyes vizsgálatok arra utalnak, hogy a tetraploid nádnövény jobb kompetitor, és ez összefüggésben állhat különösen invazív terjedésével az észak-amerikai kontinensen, ahol számos élőhelyen szorít ki őshonos és korábban domináns fajokat (Chambers és mtsai, 1999). A Duna-delta vizeiben az eltérő ploiditású állományok között területi elkülönülés figyelhető meg. A sekélyebb, mérsékeltén sós vizekben az alacsonyabb növekedésű, de a sókoncentrációval szemben nagyobb tűrőképességet mutató tetraploid, míg a mélyebb édesvizekben az oktoploid „óriásnád” fordul elő gyakrabban (Paucă-Comănescu és mtsai, 1999). Ennek ellenére kimutattak már egymás közelében élő, különböző ploiditású állományokat, melyek között nem találtak morfológiai vagy élőhely szerinti elkülönülést (Clevering és Lissner, 1999).

A ploiditás-szinten túlmenően az egyes nádnövények, illetve klonális nádasállományok között további genetikai különbségek is jelen lehetnek akár egy élőhelyen belül is, ami megjelenhet a nádnövény morfológiai jellemzőiben is. Kühl és mtsai (1999) például négy eltérő genotípusú és fenotípusú, egymás mellett növekvő nádasállomány jelenlétét igazolta ugyanabban a tóban.

Az emergens növényeknek, köztük a nádnak is összetett szerepe van a vízminőség alakításában. Egymással szorosan összefüggő és rendkívül komplex fiziko-kémiai (szűrés, adszorpció), kémiai (precipitáció, oxidáció/redukció) és biológiai (bakteriális, növényi metabolizmus) folyamatok együttese révén valósul meg a szennyező anyagok lebontása és/vagy eltávolítása. Az egyes makrofiton állományok szerepét a vízminőség javításában legrészletesebben mesterséges vizes élőhelyeken („constructed wetlands”) tanulmányozták. Brix (1994, 1997) az alábbiakban foglalta össze a mesterséges lápok növényzetének szerepét a víztisztítási folyamatokban. A vegetáció lecsökkenti a víz áramlását, ezáltal elősegíti a lebegő szilárd anyagok ülepedését, megakadályozza az üledék felkavarodását. Az áramlás csökkenésével megnövekszik az idő, amíg a növény felülete a víz egy meghatározott részével érintkezik, így a növények víz alá merülő szár- és levélrészei, valamint az üledékbe ágyazott

gyökerek és rizómák a felületükhöz asszociált mikróbaközösségek kialakulását teszik lehetővé. Többnyire ezeken a felületeken zajlik a különböző szerves és szervetlen anyagok mikrobiális transzformálása. Az emergens vízi növények és köztük a nád kiterjedt aerenchima rendszerrel rendelkeznek (Engloner és Papp, 2006). Ennek segítségével gyökereiken keresztül oxigént juttatnak gyökérkörnyezetükbe és aerálják azt. A gyökér felületének közelében ezáltal részben oxikus mikrokörnyezetet hoznak létre, amelyben számos aerob mikroorganizmus számára biztosítanak megfelelő életteret, lehetővé téve a szerves anyagok aerob lebontását (Micsinai és mtsai, 2003). A szerves anyagok lebontásában és átalakításában ezen túlmenően a rizoszféra anaerob baktériumközösségei is fontos szerepet játszanak. A növény a növekedéséhez szükséges nagy mennyiségű tápanyagot főként a gyökerein keresztül veszi fel és építi be. A növényi biomassza, és általa a szennyvízből felvett anyagok egy része, ezután aratással kivonható a rendszerből.

A nád a legutóbbi időkben az észak-amerikai kontinensen agresszív terjedése miatt, Európában pedig a vizes élőhelyekről való visszaszorulása, elhalása miatt kapott kiemelt figyelmet. Ostendorp (1989), valamint Kovács és mtsai (1989) egy időben írták le az Európában és Magyarországon már 50 éve megfigyelt nádpusztulást, és felhívták a figyelmet nádasaink romló állapotára, sürgetve további vizsgálatok elvégzésének szükségességét.

A nádpusztulás legszembetűnőbb megnyilvánulása az, hogy az eredetileg zárt nádasállományok a nyíltvíz felől felszabdálódnak, „babásodnak” és visszahúzódnak. A környezeti tényezők változásának eredményeként módosulhat a nádas fajösszetétele, a nagyobb kompetíciós képességű mocsári fajok (pl. széleslevelű gyékény, harmatkása) elterjedhetnek. A kevert, több idegen fajt tartalmazó nádasállomány a leromlás kezdetét jelzi, mivel a homogén nádasnál kevésbé ellenálló.

A károsodott nádegyedek példányai alacsonyak, vékonyak, és a szklerenchima szövetek arányának csökkenése miatt törékenyek. Fejlődésükben csak a vegetatív állapotig jutnak el. Gyakran észlelhető a nádlevelek (egyes helyeken az egész nádnövény) sárgulása, elhalása. Megfigyelhető még az idő előtti öregedés, a rügyek és rizómák elhalása, a szállító szövetekben elzáródások kialakulása, a kéregben sejtfal lignifikáció és szuberizáció. A szállítószövetekben kialakuló kallusz többek között blokkolja a gáztranszportot is (Armstrong és mtsai, 1996a).

A jelenség leírása óta a nádasok pusztulásának számos lehetséges okára derült fény. E tényezők közé sorolható az eutrofizáció (Cizková és mtsai, 1996; Kubin és Melzer, 1996), a hullámozás és az emelőök okozta mechanikai sérülések (Sukopp és Markstein, 1989), a megváltoztatott vízszint (Dinka és mtsai, 1995; Rea, 1996), a rovarok és gombák okozta

károsodások (Fuchs, 1993; Armstrong és mtsai, 1996c), továbbá a nádarató gépek pusztító hatása (Dinka és mtsai., 1995).

A nádpusztulás egyik legjelentősebb kiváltó oka ezek közül az eutrofizáció, ami hatását leginkább indirekt módon fejt ki. A rendelkezésre álló bőséges tápanyagkinálat miatt a nád föld feletti produkciója megugrik, mivel azonban a szöveti struktúrákban a parenchyma aránya növekszik meg, a nádszálak sérülékenyebbé válnak. Ezt a nádszálak mechanikai vizsgálata is megerősítette (Fischl és Berke, 1998). A hullámzás, szél és egyéb mechanikai hatások így könnyebben fizikai károsodást okozhatnak, amit másodlagos hajtások létrehozása követ. Ez a rendelkezésre álló raktározott tápanyagkészleteket erősen csökkenti, akár oly mértékben is, hogy kétségesse teszi az eseményt követő teljes regenerációt (Cizkova és mtsai, 2001).

Az eutrofizáció nemcsak a nádas, hanem az algák produkcióját is megnöveli. Elsősorban a kékalgák elszaporodása okozhat gondokat, mivel egyes fajaik cianotoxinokat termelhetnek. Az eutróf felszíni vizekben kialakuló *Microcystis aeruginosa* vízvirágzások során termelődő mikrocisztin hatása kísérletesen igazolt. Bejut a nádnövénybe (Pflugmacher és mtsai, 2001) és hatással van növények fejlődésére, növekedésére (Borbély és mtsai, 1998; M-Hamvas és mtsai, 2003). A nádnövény parásodással, lignin beépítéssel védekezhet a toxinok hatása ellen.

Kovács és mtsai (1989) elsőként hívták fel a figyelmet a szerves savak és a szulfid, mint fitotoxinok szerepére a nádnövény pusztulásában. A nád földalatti részeinek pusztulása és lebomlása a szulfid és a volatilis zsírsavak, pl. ecetsav, propionsav, vajsav, valériánsav és kapronsav megnövekedett termeléséhez vezethet, ami káros lehet a növény számára. A szulfid elsősorban az anaerob szulfátredukáló, míg a szerves savak az anaerob fermentáló baktériumok tevékenysége folytán kerülnek a nádrizoszféra környezetébe. Redukáló körülmények és alacsony pH mellett koncentrációjuk elérheti a növényekre toxikus szintet is (Kovács és mtsai, 1989, Armstrong és Armstrong, 2001), ilymódon fontos szerepet játszhatnak a pusztuló növényre jellemző szindrómák kialakulásában (Armstrong és mtsai., 1996b).

A szulfid elsősorban az aerob légzés inhibitoraként fejt ki hatását (Armstrong és mtsai, 1996b). Az ecetsavról leírták, hogy a sejtmembrán könnyebb átjárhatóságát okozza, így a gyökerekben az ionok elvesztéséhez vezet. Az ecetsav és a többi volatilis monokarbonsav toxicitásának következményei közé tartozik még, hogy elzáródásokat okoznak a belső aerációs rendszerben. Ezek kiterjedhetnek a rizómákra, a gyökerekre, valamint a gyökér-rizóma kapcsolódásokra, ahol is az aerenchima csatornákat kallusz tömíti

el. Szélsőséges esetekben ezek az elzáródások megakadályozhatják az oxigén diffúzióját, és ezzel anoxiát idézhetnek elő a szövetekben. A gyökerekben és rizómákban az intercelluláris terekbe lignifikált anyag rakódik, ami szintén gátolja az oxigén ellátást. További károsodások lépnek fel a szállító szövetekben, a floémen és a xilémen belül is. A sejtfalból származó nem cellulóz poliszacharid komponensek lerakódása a víz, az ásványi sók és a metabolitok szabad áramlását hátráltatják, visszavetve ezzel a nád növekedését, tápanyag raktározását és áttelelési képességét (Armstrong és Armstrong, 2001; Engloner és mtsai, 2004).

A volatilis zsírsavak fitotoxicitására mindazonáltal erősen kihat a környezet pH-ja. Az alacsony szénatomszámú zsírsavak nem disszociált, lipidoldékony formája toxikus a növényre, ami alacsony pH-értékeknél túlsúlyban van a disszociált formához képest. A molekulák 63-70%-a pH 4,5 érték mellett disszociálatlan formában van jelen, míg pH 6,0 érték körül már 92%-nál nagyobb arányban fordul elő az ionizált forma (Armstrong és Armstrong, 1999). Laboratóriumi vizsgálatok alapján az ecetsav, a propionsav, a vajsav, az izovajsav és a kapronsav 0,9 és 1,4 mM közötti koncentrációban pH 4,5 értéknél erősen toxikusnak mutatkozott, pH 6,0 körül azonban relatíve ártalmatlannak bizonyult. A propionsav magasabb koncentráción, 10 mM körül, már pH 6,0 mellett is erősen toxikus hatást produkált (Armstrong és Armstrong, 2001).

#### **4.4.3. A RIZOSZFÉRA, MINT MIKROBIÁLIS ÉLETTÉR**

A rizoszféra fogalmát tágabb és szűkebb értelmezésben is használják. Walker és mtsai (2003) rizoszférának a gyökerek és a gyökérfelület körüli talajréteg együttesét tekintik, amelyen belül a gyökér hatása érvényesül. A gyökér közvetlen felületét rizoplánnak; a gyökér belső szöveti terét pedig endorizoszférának nevezzük. A növényi szöveteken belüli élőhelyeken található szervezeteket endofitonoknak nevezzük (Lynch, 1983).

A növény többféle módon befolyásolja gyökereinek környezetét. Szervesanyag termelésének egy részét, pl. exudátumok formájában környezetébe juttatja. A gyökerek által kiválasztott nedvekben a növényi szövetekben jelenlévő vegyületek is megtalálhatók, például cukrok, vitaminok (úgy mint tiamin, riboflavin, piridoxin, stb.), szerves savak (mint maleinsav, citromsav), aminosavak, benzolsavak, fenol- és egyéb vegyületek (Miersch és mtsai, 1989). A jelenlévő vegyületek összetétele mindig jellemző az adott fajra, illetve alfajra. Mezőgazdasági növények vizsgálata alapján úgy becsülték, hogy a gyökerek által kiválasztott szerves szén mennyisége a fotoszintézis során képződő összes termék 10-40%-át is elérheti (Helal és Sauerbeck, 1989). A rizoszféra ezen kívül tartalmazhat váladékokat,

nyálkát és elhalt sejtanyagokat, amelyek egyidejűleg befolyásolják a gyökérszónában lejátszódó biológiai folyamatokat.

A növények a szerves anyagok kijuttatásán túl, a vízzel elárasztott talajokban oxigénvezető képességük révén fejtik ki a legmarkánsabb hatást. Amíg jól átlegegőzött talajokban a gyökerek jelenléte inkább kismértékű nettó széndioxid-koncentráció növekedést okoz, addig a tartósan víz alatt lévő, a körülményekhez aerenchyma fejlesztésével adaptálódott növények gyökerei az oxigén forrásává válnak. E gyökerek köré az oxigén parciális nyomásának és a redoxpotenciálnak megfelelő gradiensben települnek be a különböző terminális elektronakceptorokat (sorrendben: oxigén, nitrát, vas (III) és mangán (IV) ionok, szulfát, széndioxid) hasznosítani képes aerob, fakultatív anaerob és obligát anaerob légző, továbbá fermentatív mikroorganizmusok (Kovács, 2001; Micsinai és mtsai, 2003). A közösségi anyagcsere révén képződő központi jelentőségű anyagcsere termékek (pl. hidrogén, acetát) gradiensei a képet még bonyolultabbá teszik, ahogy arról már az irodalmi áttekintés elején szóltunk (Élet anaerob körülmények között, 1. ábra). Mindezek alapján nem meglepő, hogy a különböző növények rizoszférijából ezidáig sokféle különböző mikrobiális közösség és faj jelenlétét írták le, aerob és anaerob mikroorganizmusokét egyaránt.

Ezek közül egy különleges csoport az endofita mikroorganizmusoké, amelyek életciklusuk legnagyobb, ha nem egész részében növényekhez asszociáltak, azokon belül élnek. Általában nem patogének a növényre nézve, gyakran előnyös tulajdonságokkal is bírnak (pl. nitrogén-kötés). A gyökereket kolonizáló endofita szervezetek között gombákat és baktériumokat egyaránt találhatunk. A baktériumok közül meglepő módon szigorúan anaerob csoportokat is kimutattak az endorizoszférijából in situ hibridizációs módszerrel, úgymint acetogéneket, *Clostridium* fajokat és szulfátredukáló baktériumokat (Küsel és mtsai, 1999). Vizsgálataik alapján a szulfátredukálók közül a *Desulfovibrio* nemzetség tagjai jelen voltak az összes epidermisz sejtben, és a kéregparenchima sejteknek is körülbelül 60%-át kolonizálták. Az *Acetobacterium* és *Clostridium* fajok szintén megtalálhatók voltak a rizoplánban, de a kéregparenchima sejteknek jóval kisebb részét kolonizálták és csak a legkülső rétegben. Feltételezhető, hogy a növényi szövetek védelmében, többek között a növény által is kiválasztott tápanyagokért folytatott versenyben ezek a baktériumok előnyt élveznek, és mivel mind a *Clostridiumok*, mind a szulfátredukálók között számos nitrogénkötő fajt találunk, e képességük révén növekedést serkentő hatással lehetnek az őket befogadó növényre.

A *Clostridium* fajok előfordulása a rizoszférijában igen változatos lehet. Singh és mtsai (2007) a fűfélék rizoszfériját vizsgálva jó levegő ellátottságú talajokban nem találtak

*Clostridium* fajokat. A bab és az árpa rizoszférájában azonban kimutatták, hogy nagy számban vannak jelen nitrogén-fixáló *Clostridium*ok (Taha és mtsai, 1977). A rizs rizoszférájának anoxikus környezetéből szintén nagy számban kerültek elő *Clostridium* fajok (Lu és mtsai, 2006), valamint azonosították őket úszólápon növekedő keskenylevelű gyékény rizoszférájából is (Kovács, 2001). Ezen túlmenően Doi és mtsai (2007) molekuláris biológiai (PCR-DGGE) módszereket alkalmazva a *Clostridium bifermentans* fajt találták az egyik domináns rizoszféra baktériumnak a rizs esetében. A rizoszférában élő *Clostridium* fajokkal kapcsolatban növényi növekedést serkentő hatást is leírtak. Polyanskaya és mtsai (2002) ugyanis egy a borsó rizoszférájából izolált *Clostridium* esetében azt találták, hogy fungisztikus hatást gyakorol a gyökér környezetében, és ennek révén szerepe lehet a termés mennyiségének megnövekedésében is.

A szulfátredukáló baktériumok esetében a legintenzívebben az egyes tengeri makrofitonok (Rooney-Varga és mtsai, 1997; Hines és mtsai, 1999; Küsel és mtsai, 1999; Cifuentes és mtsai, 2003) és az elárasztott rizsföldek (Wind és Conrad, 1997; Wind és mtsai, 1999; Stubner és Meuser, 2000; Stubner, 2004) rizoszféráját vizsgálták. Minden esetben azt találták, hogy a szulfátredukációs aktivitás megemelkedik a rizoszférában. A rizs esetében MPN csíraszámbebecslésen alapuló vizsgálatok rámutattak arra is, hogy a rizoplánban főleg a részlegesen oxidáló SRB (mint pl. a *Desulfovibrio*) fajok voltak jelen nagy számban, míg az ecetsavat (acetátot) is oxidáló SRB a környező rizoszféra talajban voltak jelen nagyobb számban. A fenti környezetekkel szemben viszonylag keveset tudunk az édesvízi növények rizoszféráját kolonizáló szulfátredukáló baktériumokról. A *Littorella uniflora* és az *Isoetes lacustris* rizoszféráját vizsgálva a dániai Kalgard tóban Holmer és mtsai (1998) kimutatták, hogy a szulfátredukció azon túl, hogy szoros kapcsolatban van a rizoszféra szervesanyag tartalmával és redox potenciáljával, összefüggést mutat a növényállomány sűrűségével is. Viszonylag magas szulfátredukációs rátákat magas szervesanyag tartalom, alacsony redox potenciál és alacsony növény sűrűség mellett kaptak. Acha és mtsai (2005) egy speciális rizoszféra környezetet tanulmányoztak, egy úszóláp rizoszféra környezetét az Amazonas medencéjében található egyik holtág tavon (La Granja). Szulfátredukáló baktériumokra specifikus PCR primereket alkalmazva 5, azokkal elkülöníthető szulfátredukáló csoport (*Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*-*Desulfonema*-*Desulfosarcina* és *Desulfovibrio*-*Desulfomicrobium* nemzetségekkel) jelenlétét mutatták ki, amelyek közül a *Desulfovibrio*-*Desulfomicrobium* csoportot találták a legdominánsabbnak. A főképp acetátot hasznosító *Desulfobacter* nemzetség csak kis gyakorisággal, a *Desulfobacterium* pedig egyáltalán nem került elő a vizsgálatok során. Egy magyarországi

úszólápon (a Szigetcsép melletti Csupics-sziget úszólápvilága) állományalkotó keskenylevelű gyékény rizoplánjáról Kovács (2001) szintén kimutatott szulfátredukáló baktériumokat molekuláris klónozással a *Desulfonema*, a *Desulfobacula* és a *Desulfovibrio* nemzetségek rokonsági köréből, és felhívta a figyelmet ezeknek a szervezeteknek a szerepére az aerob rizoplánban.

Kiemelkedő jelentősége ellenére a nád rizoszférájával kapcsolatban ezidáig nem sok eredmény látott napvilágot. A legtöbb információt Burke és mtsai (2002) munkája nyújtja ezen a téren. Torkolatvidéken növő *Spartina* és *Phragmites* fajok gyökérkörnyezetének mikrobiológiai vizsgálata során a nád esetében alig találtak arbuszkuláris mikorrhizát és eukarióta gombákat, mely feltehetően az elárasztott állapottal és így a nád gyökérkörnyezetének alacsonyabb redoxpotenciáljával hozható összefüggésbe. In situ hibridizációs módszerrel a vizsgált baktériumok közül az alfa-, gamma- és delta-Proteobaktériumok közé tartozó szervezeteket mutatták ki dominánsnak. Szignifikáns szezonális fluktuációt nem találtak a sejtszámokban, de a legmagasabb értékeket a nád reprodukív szakaszában, augusztusban határozták meg. A metanogének száma a magas szulfátszint miatt alacsony volt, de a szulfátredukálók mennyiségét a kísérlet módszertani limitációi miatt nem tudták megállapítani. Micsinai és mtsai (2003) munkájukban az egészség és pusztuló nádasok rizómáinak külső és belső felületein megtelepedő aerob baktérium közösségeket vizsgálták. Tenyésztésen alapuló vizsgálatokkal nyert eredményeik alapján mind az egészséges, mind a pusztuló rizómákat sajátos baktériumközösség jellemezte. Míg az egészséges nádrizómákon ősszel a fakultatív anaerob fermentáló baktériumok, addig a pusztuló mintákon egy jellemzően szaprofita baktérium közösség képe rajzolódott ki. A nyári minták esetében azonban ilyen határozott elválás nem volt tapasztalható, azokon főképp obligát aerob respiratórikus mikroorganizmusok domináltak. Mindemellett a pusztuló nádrizómákon obligát patogén baktériumokat nem találtak, az egészséges rizómák esetében azonban több a növény számára hasznos faj (pl. *Pseudomonas azotoformans*, *Pantoea agglomerans*) jelenlétét is kimutatták.

#### **4.5. A BAKTÉRIUMOK DIVERZITÁSÁT VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK**

A mikrobaközösségek szerepének és működésének jobb megértéséhez alapvető feltétel a közösségek összetételének leírása. Hagyományosan ezt a környezeti minták tenyésztetbe vonásával oldják meg, amelynek során tiszta törzstenyészeteket állítanak elő. Napjaink mikrobiális ökológiai kutatásainak egyik fő problémája azonban a „tenyésztésbe



nem vonható” baktériumok kérdése, amelyek aránya egyes becslések alapján meghaladhatja a 99%-ot is (Amann és mtsai, 1995). Hasonló a helyzet az eukarióta egysejtűek esetében is (Diez és mtsai, 2001). Ennek az irodalomban „great plate count anomaly”-ként (Staley és Konopka, 1985) elnevezett problémának a hátterében az áll, hogy az egyes tenyésztési feltételek rendkívül specifikusak, és csak kevésbé reprezentálják a természetes környezetet. Nem tudjuk például a természetes környezetekben létező mikrobiális kapcsolatokat megfelelően reprodukálni. A természetben a különböző fajokhoz tartozó baktériumpopulációk együttélnek, és köztük szignál-vegyületek, növekedési faktorok és az energetikai anyagcserében résztvevő metabolitok élénk transzportja zajlik. Mindez azonban hiányzik monoklonális törzsek esetén (Overmann et al., 2000). A természetes környezetek másik eltérése a tenyésztéshez képest az, hogy a bioszférát felépítő ökoszisztémák fizikailag és kémiaiilag nem homogének, sokkal inkább a mozaikosság jellemző rájuk. Máshol találhatók az egyes metabolitokat termelő és máshol az azokat fogyasztó mikroorganizmusok, így köztük különféle anyagok koncentráció gradiensei alakulhatnak ki. Ha egy mikroba aktivitását több vegyület is limitálja, és ezek különböző irányból érkeznek, akkor az azokat hasznosító szervezetek az anyagok találkozásánál fognak elhelyezkedni, és ellentétes lefutású gradienseket teremtenek. Mindezt tenyésztés esetén mesterséges gradiensek létrehozásával lehet ugyan modellezni, azonban a kivitelezés még meglehetősen sok problémát vet fel (Brune és mtsai, 2000).

Tenyésztéstől független módszereket választva, a hagyományos mikroszkópos technikák segítségével sem detektálható a legtöbb baktérium, mert azok például a talaj vagy az üledék szemcséihez tapadnak. A fluoreszcens festékek alkalmazása javítja ugyan az eredményt (Ito és mtsai, 2002), de nem segít a fajok azonosításában. A molekuláris biológiai technikák ugyanakkor új lehetőségeket nyitnak ebben az irányban. Itt két fő feladattal kell szembenézni. Egyrészt ki kell vonni az egyes csoportokra, illetve fajokra jellemző molekulákat a mintából, másrészt el kell őket választani egymástól.

Az adott környezetből kivont vegyületeket, elsősorban a zsírsavakat, kinonokat és nukleinsavakat számtalan úton használják fel a közösségek vizsgálatára. Az úgynevezett kemotaxonómiai vizsgálati módszerek közül a kinonok vizsgálata elsősorban azt tükrözi, hogy a közösségben az aerob vagy az anaerob anyagcsere dominál, míg egyes zsírsavak már a nemzetségek, illetve fajok azonosítására is alkalmasak lehetnek (Hedrick és mtsai, 1986; Widmer és mtsai, 2001; Tauber és mtsai, 2007). A nukleinsavak analíziséen alapuló módszerek közül a közösségi DNS közvetlen analízise, mint például a DNS/DNS hibridizáció jó áttekintő képet ad a közösség fajszámáról, de nem segít az egyes fajok

azonosításában. A sokféle PCR-alapú technika esetében azonban már lehetőségünk van a közösség szerkezetének mélyebb megismerésére is.

A polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction, PCR) in vitro módszer egy meghatározott DNS szakasz enzimatisz szintézisére. A reakció kezdetén a DNS szálait hővel szétválasztjuk (denaturáció), majd a reakcióelegyet lehűtve két oligonukleotid primer (reverz, illetve forward) hibridizál a DNS komplementer szálaihoz a felszaporítandó szakasz két végén (anelláció). A primerektől kiinduló komplementer DNS szálak szintézisét (extenzió, vagy elongáció) DNS polimeráz enzim katalizálja. A reakcióhoz a leggyakrabban termofil baktériumokból izolált hőstabil polimeráz enzimet használnak, mint például a (*Thermus aquaticus*) Taq polimerázt. Így a reakció során a magas anellációs hőmérséklet pontos bázispárosodást tesz lehetővé, a polimeráz pedig magas hőmérsékleten hatékonyan és kis hibaszázalékkal dolgozik, de a hőtűrés legfontosabb következménye a folyamat automatizálhatósága. Az automatizált ciklusok egymás utáni sorozata a kívánt DNS szakasz megsokszorozódását eredményezi. Ezt a módszert tiszta tenyészetek bizonyos DNS szakaszainak a vizsgálatára is alkalmazzák, de segítségével egy adott baktériumközösség összes genomi DNS-éből is felszaporítható a kívánt génszakaszok keveréke. Amennyiben a közösségalkotó mikroorganizmusokat valamilyen szinten identifikálni szeretnénk, akkor filogenetikai „marker” szekvenciákat szaporítunk fel a további vizsgálatokhoz. Filogenetikai „marker”-nek tekinthetünk egy génszakaszt akkor, ha az a vizsgált csoport minden tagja számára esszenciális terméket kódol, és variábilis, valamint konzervatív régiókat egyaránt tartalmaz a kisebb, illetve nagyobb léptékű evolúciós változások filogenetikai nyomon követéséhez. A mikrobiális ökológiai kutatásokban az egyik leggyakrabban alkalmazott ilyen célszekvencia a 16S rRNS-t kódoló génszakasz (16S rDNS). A 16S rDNS konzervatív régióin belül lehetőség van továbbá az egyes filogenetikailag koherens csoportok (osztályok, családok, vagy akár nemzetségek) minden tagjára jellemző primereket tervezni, és azok segítségével a komplex mikrobiális közösségekből csak az adott csoport tagjait felszaporítani. Filogenetikai „marker” molekulák lehetnek még a 16S rDNS-en kívül az egyes (akár csoportokra specifikus) funkciógének is, amennyiben a fenti követelményeknek megfelelnek. Sőt nemcsak maga a gén (16S rDNS, vagy funkciógén), hanem annak RNS terméke (16S rRNS, illetve mRNS) is szolgálhat „marker” szekvenciaként reverz transzkripción alapuló PCR-ben felszaporítva a környezetből. Ez utóbbi alkalmazásával nem általánosan a környezetben jelenlévő, hanem azok közül a metabolikusan is aktív fajokat tudjuk azonosítani, mivel ezeknél számolhatunk detektálható mennyiségű RNS termeléssel (Nikolausz és mtsai, 2004).

Amennyiben a felszaporított közösségi DNS szakaszokból nem kívánjuk az egyes fajokat meghatározni, lehetőségünk van az egyes baktériumok genetikai ujjlenyomatainak együttes analizisére. Erre szolgáló módszer az RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analízis, amelynek során a DNS keveréket restriktációs endonukleázokkal emésztjük. Ezek típusuktól függően különböző szekvencia részleteket ismernek fel, és azok mentén elhasítják a DNS molekulákat. Mivel ezek a célszekvenciák fajonként eltérő pozíciókban lehetnek jelen, azok filogenetikai távolságától függő mértékben, a különböző fajoknál eltérő hosszúságú elhasított DNS szakaszokat kaphatunk eredményül. Amennyiben a vizsgált DNS szakasz a 16S rDNS, az RFLP analízist gyakran ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) rövidítéssel jelölik. A módszert szintén használják tiszta törzsek genotípusos elkülönítésére gélelektroforézissel szétválasztva az egyes törzsek esetlegesen eltérő méretű hasítási termékeiket, de a felszaporított közösségi DNS keveréken alkalmazva is alkalmas lehet különböző környezetek diverzitása közti különbségek vizsgálatára.

A módszer egy továbbfejlesztett változata a T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) vizsgálat, amelynek során a felszaporított DNS szekvenciákat az egyik végükön megjelölik (A PCR-ben az 5' végén jelölt forward vagy reverz primer alkalmazásával) leggyakrabban fluoreszcens festékekkel. Ezt követően gélelektroforézissel szétválasztva a hasítással kapott termékeket, a terminálisan jelölt fragmentumok elkülöníthetők a többitől. Mivel az alkalmazott restriktációs endonukleáz a különböző fajoknál különböző pozíciókban hasíthat, itt is a faji összetételre jellemző jelölt hasítási mintázatot kapunk eredményül. Sőt, ha megfelelően érzékeny módszert (pl. kapilláris gélelektroforézis) alkalmazunk, akkor pontosan meghatározhatjuk a terminális szakaszok hosszát és az endonukleáz célszekvenciája, valamint a nemzetközi adatbázisokban tárolt teljes szekvenciák alapján következtethetünk az egyes fajok, vagy nemzetségek identitására is. Mind az RFLP, mind a T-RFLP vizsgálatokra igaz, hogy minél több restriktációs endonukleázt alkalmazunk párhuzamosan, annál nagyobb valószínűséggel fogunk valamelyiknél eltérő hasítási mintázatot kapni a filogenetikailag különböző mértékben elkülönülő fajok esetében.

Az elektroforetikus módszerek közül a DGGE-t (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) az orvostudományban alkalmazták először pontmutációk detektálására. A környezeti mikrobiológiába Muyzer és munkatársai (1993) vezették be használatát. DGGE segítségével a közel azonos hosszúságú, de eltérő szekvenciájú DNS-ek választhatók szét. Ennek alapja, hogy a gél egy lineárisan növekvő DNS denaturáló (urea és formamid) gradienst tartalmaz. Viszonylag magas hőmérsékleten futtatva, megfelelő koncentráció

hatására a dupla szálú DNS részlegesen denaturálódik („megolvad”), ezáltal csökken a mobilitása a teljesen helikális formához viszonyítva. A vizsgált DNS fragmentum egyes részei, százalékos G+C tartalmuknak és szekvenciájuknak megfelelően, egymástól eltérő „olvadásponttal” rendelkeznek. Mikor a legalacsonyabb „olvadáspontú” szakasz a gélben eléri a megfelelő denaturáló koncentrációt, a DNS molekula két szála részben szétválik, és a gélben a futása jelentősen lelassul. Az egyes fajokhoz tartozó különböző szekvenciákban ezeknek a szakaszoknak az „olvadáspontja” eltérő, így az egyes molekulák mobilitása a gélben különböző távolságoknál csökken jelentős mértékben, vagyis egymástól elváltnak (x. ábra). Az egyes elkülönülő csíkok ezután a DNS specifikus festésével megjeleníthetők, a gélből kivághatók, belőlük a DNS visszanyerhető, és így a már fajokra jellemző szakaszok szekvenálhatók. Ezzel a módszerrel már a pontmutációs szekvencia-eltérések 50%-a is detektálható 500-600 bázispár hosszú DNS fragmentum nagyságig (Muyzer és mtsai, 1993). Gondot okozhat azonban, ha a két szál teljesen elválik egymástól és így a gélben két csíkot adnak. A probléma azonban kiküszöbölhető, ha egy GC-gazdag régiót toldunk a molekula végére, ami egy különösen magas „olvadáspontú” szakasznak számít. A hozzáillesztést PCR útján lehet megvalósítani, amikor is egy körülbelül 40 bázispár hosszú GC-gazdag szekvenciát alkalmazunk az egyik primer 5' végén. Ez még magasabb denaturáló koncentrációk esetén is, mint egy kapocs fogja össze a molekula két külön feltekeredett szálát. Így azok egy csíkot adnak a gélen, és a futásuk is jobban lelassul. Mindezeket túl új génszakaszok DGGE analízisbe való bevonása előtt szükséges lehet a módszert optimalizálni, azaz meghatározni a denaturáló koncentráció gradiens kiterjedését, valamint az elektroforézis paramétereit (feszültség és idő), hogy az újonnan alkalmazott (az előzőektől eltérő hosszúságú és eltérő olvadási paraméterekkel jellemezhető) génszakaszok elválása optimálisan végbemenjen az analízis során.

A molekuláris klónozás szintén lehetővé teszi az egyes fajokra jellemző DNS fragmentumok elválasztását és szekvenálását. A klónozás során a PCR-ben felszaporított közösségi szekvencia keverék egyes fragmentumait (inzerterek) úgynevezett klónozó vektorokba (pl. plazmidok) ligáljuk ligáz enzimek segítségével. Ezekkel azután megfelelő módszerrel kompetenssé tett sejteket (pl. *Escherichia coli* sejteket) transzformálunk olyan arányban, hogy nagy valószínűséggel minden sejtbe egy darab, a közösségi DNS egyetlen szekvenciáját tartalmazó vektor kerüljön. Ezután az egyes sejteket, és azokkal együtt az inzertet tartalmazó vektorokat is adott szelektív tápközegen felszaporítjuk úgy, hogy minden sejtől különálló kolóniákat kapjunk. Ezekből az összes-, vagy csak a plazmid DNS-t

kivonva és az inzertet PCR-ben felszaporítva, lehetőségünk nyílik a fajokra jellemző inzert szekvenciák meghatározására.

A különösen nehezen tenyészthető szulfátredukáló baktériumok esetében a fenti molekuláris módszerek mindegyikét alkalmazták már a csoportra specifikus vizsgálatokban (Chang és mtsai, 2001; Cifuentes és mtsai, 2003; Leloup és mtsai, 2006; Overmann és mtsai, 1999). Mivel a SRB polifiletikus származásúak, nem lehetséges mindössze egyetlen primer párral felszaporítani az összes (pl. delta-Proteobacteria, vagy Firmicutes) szulfátredukáló 16S rDNS szakaszát. Amann és mtsai (1990) delta-Proteobaktérium SRB-ra tervezett forward primere (SRB385f) is felszaporított nem szulfátredukáló delta-Proteobaktérium 16S rDNS szakaszokat, valamint egyes Gram-pozitív baktériumok adott DNS szakaszait is. Overmann és mtsai (1999) ezért az akkori Desulfovibrionaceae családra (*Desulfovibrio* és *Desulfomicrobium* nemzetségek) fejlesztettek ki specifikus primer párt és alkalmazták PCR-DGGE vizsgálataikhoz. Az általuk alkalmazott primerek sem tűntek azonban eléggé specifikusnak, mivel a Geobacteraceae családból is szaporítottak fel 16S rDNS szekvenciákat (Wieringa és mtsai, 2000). Specifikus primereket terveztek még Daly és mtsai (2000) is a Gram-negatív mezofil (delta-Proteobaktérium) és a Gram-pozitív spóráképző (Firmicutes) SRB 6 csoportjára (*Desulfovibrio-Desulfomicrobium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacterium*, *Desulfobacter* és *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* nemzetségek alkotta csoportok). A primereket (pl. DSV230f és DSV838r primer pár a *Desulfovibrio* és *Desulfomicrobium* nemzetségekre) az akkori szekvencia adatbázisokban található 16S rDNS szulfátredukáló szekvenciák bevonásával tervezték, majd tiszta törzsek és környezeti minták PCR analízisei során a gyakorlatban is kipróbálták. Hogy a primerek specificitását biztosítsák, azokat bizonyos pontokon degenerálttá tették, azaz az adott pontokon több különböző nukleotid beépítését engedélyezték. Az eredményeiket a felszaporított szekvencia szakaszokon belül hibridizáló, csoport specifikus oligonukleotid próbák segítségével is ellenőrizték. Ezek szerint, bár a primerek degeneráltak, egyik primer pár sem szaporított fel idegen 16S DNS-t. Az ő általuk tervezett primer párokon alapul Acha és mtsai (2006) által az Amazonas menti úszólápok rizoszféra környezetének szulfátredukáló baktériumain végzett, már említett munkája.

A SRB 16S rDNS szekvenciáinak szelektív felszaporításával kapcsolatos problémák kikerülésére az 1990-es évek végén alternatív megoldás született. Wagner és mtsai (1998) a rendelkezésre álló Bacteria és Archea szekvenciák alapján (*Desulfovibrio vulgaris* és *Archaeoglobus fulgidus*) egy másik filogenetikai markerre, az összes szulfátredukálóra specifikus disszimilatorikus szulfit reduktáz enzim  $\alpha$ - és  $\beta$ -alegységét (DsrAB) kódoló gén

(*dsrAB*) konzervatív régióra tervezetek primer párt (DSR1F és DSR4R). A rendelkezésre álló *dsrAB* szekvenciák köre ezt követően gyorsan bővülni kezdett (Klein és mtsai, 2001) és bebizonyosodott, hogy a 16S rRNS és a DsrAB alapú filogenetikai fák topológiája hasonló, azaz az új módszer alkalmas filogenetikai analízisre is. A *dsrAB* szekvenciák vizsgálatát azóta széles körben alkalmazzák a szulfátredukáló baktérium közösségek szerkezetének feltárására leggyakrabban klónozás segítségével (Dubilier és mtsai, 2001; Leloup és mtsai, 2006), de újabban már beszámoltak sikeres alkalmazásáról mind RNS, mind DNS alapú PCR és DGGE analízis kapcsán is (Dar és mtsai, 2007).

A szulfátredukáló baktériumokkal összehasonlítva jóval kevesebb molekuláris biológiai analízis irányult idáig a *Clostridium* közösségek tanulmányozására. Ennek egyik lehetséges oka, hogy a *Clostridium*ok a viszonylag könnyen (és endospóráik révén akár szelektíven) tenyésztethető mikroorganizmusok közé tartoznak. A legtöbb molekuláris biológiai munka humán vonatkozású, és például az emberi bélcsatornát kolonizáló (Song és mtsai, 2004), vagy patogénitásuk miatt jelentős (Kimura és mtsai, 2001) *Clostridium* fajok detektálásával foglalkozik. Dyke és McCarthy (2002) azonban már a városi szemétkerakók talajvizében fellelhető, cellulóz bontó fajokat is tartalmazó *Clostridium* csoportokra tervezett primereket alkalmazott sikerrel vizsgálatai során, de a Song és mtsai (2004) által leírt primerek is valószínűleg eredményesen használhatók természetes környezetekben.

Végül meg kell említenünk, hogy a tenyésztési módszerekhez hasonlóan a molekuláris technikáknak is számos hátrányát írták le idáig. Egyfelől ezek a módszerek is valamilyen módon szelektívek, és ebből kifolyólag torzíthatják a közösségben előforduló csoportok és fajok arányait. Ennek egyik legalapvetőbb oka a legtöbb módszer alapjául szolgáló PCR, illetve a PCR primerek szelektivitása. Sipos és mtsai (2007) mélyreható analízisek révén kimutatták, hogy a primer és célszekvenciája közötti kismértékű eltérések is milyen nagymértékben képesek torzítani a PCR termékek arányát, amihez még az alkalmazott anellációs hőmérséklet és a PCR ciklusok száma is hozzájárulhat. Az egyes technikák ezen túl további hátrányokkal is rendelkeznek. A gyors kivitelezésű és ezért monitorozásra is alkalmas módszerek (RFLP és T-RFLP) esetében például, nem tudunk szekvenciákat visszanyerni, ezért a faji identifikáció vagy nem lehetséges, vagy bizonytalan. A DGGE alkalmazásával ugyan van lehetőség szekvencia analízisre, itt azonban más problémákkal kell szembe nézni. Az egy nemzetségen belüli eltérő DNS szakaszok, de akár távoli fajok nagymértékben különböző szekvenciái is rendelkezhetnek azonos „olvadásponttal”, így egy csíkot adhatnak, ami csökkenti az észlelt diverzitást, és a csíkokban nem szekvenálható, kevert szekvenciák jelennek meg. Olyan fajoknál pedig, amelyek több

kópiában tartalmazzák a 16S rDNS operont, egy törzs több, akár néhány pontmutációban különböző 16S rDNS kópiát is tartalmazhat, de a populációban is előfordulhat genetikai heterogenitás. Ebben az esetben tehát egy fajra több csíkot kapunk, ami a diverzitás felülbecsléséhez vezet (Salles és mtsai, 2002). A klónozás esetében szintén leírtak már módszerben rejlő hibákat, például az inzertek méretéből adódó szelektivitást különböző hosszúságú PCR termékek alkalmazásakor ugyanabból a közösségből, valamint kisebb mértékben a klónozáshoz választott módszer (inzert beépülés tompa végekkel, vagy „ragadós” TA végekkel) szerint (Taylor és mtsai, 2007).

Mindezek alapján egy adott környezetben mindenképpen érdemes lehet a molekuláris módszerek eredményeit összevetni a tenyésztési eredményekkel, mert bár a fenti kitételek ellenére is a tenyésztésen alapuló technikák sokkal szelektívebbek, mégis együttes (polifázikus) alkalmazásuk révén részletgazdagabb képet kaphatunk a baktériumközösségek szerkezetéről. Különösen igaz ez abban az esetben, ha a tenyésztést több különböző molekuláris módszerrel együtt alkalmazzuk ugyanazon környezet vizsgálatára.

## 5. CÉLKITŰZÉSEK

Kiemelkedő jelentősége ellenére a nád rizoszféra baktériumközösségeit mindezidáig keveset vizsgálták. Ezen belül célzottan az anaerob mikroorganizmusokra és szerepük megismerésére irányuló kutatások tudomásunk szerint mindezidáig nem folytak. Pedig ezen szervezetek közül a *Clostridium*ok és a szulfátredukáló baktériumok, amellet, hogy alapvető fontosságúak a szerves anyagok mineralizációjában és más anyagforgalmi rendszerekben (pl. szén-, és kénkörforgalom), túlzott elszaporodásuk és aktivitásuk révén fitotoxikus hatást is gyakorolhatnak a növényre.

Kutatómunkám célkitűzéseit ezért a következőkben fogalmaztam meg:

A Velencei-tó egészséges és pusztuló nádasállományának rizoszférájában előforduló anaerob baktériumközösségek mennyiségi viszonyainak meghatározása és összehasonlítása a környező, rizoszférától mentes üledékkel tenyésztésen alapuló MPN technika segítségével;

A velencei-tavi egészséges és pusztuló nádasállományok rizoszférájában az autochton szerves és az allochton szennyező anyagok anaerob lebontási folyamataiban résztvevő, fermentáló *Clostridium* és respiratórikus anyagcserét folytató szulfátredukáló baktériumfajok tenyésztésen alapuló vizsgálata, izolált törzsek morfológiai és fiziológiai jellemzésével és reprezentatív törzsek 16S rDNS alapú taxonómiai diverzitásának feltárásával;

Különböző nádrizoszféra minták szulfátredukáló közösségi struktúrájának összehasonlítása hazánkban elsőként általunk alkalmazott és optimalizált szulfátredukálókra specifikus PCR és DGGE, mint tenyésztéstől független molekuláris biológiai ujjlenyomat módszer alkalmazásával;

A szulfátredukálók mélyebb filogenetikai diverzitásának feltárása egyidejű és összehasonlító jellegű tenyésztésen alapuló és *dsrAB* funkciógén klónkönyvtár létrehozásával végzett tenyésztéstől független vizsgálatokkal;

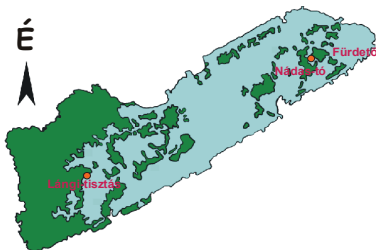
A tenyésztési módszerek fejlesztése, majd az izolált törzsek szénforrás hasznosítási képességének részletes vizsgálata, a reprezentatív törzsek és a szulfátredukáló klónok 16S rDNS-, disszimilatórikus szulfit reduktáz (*DsrAB*) gén-, illetve fehérjeszekvencia analízis révén történő identifikációja.



## 6. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 6.1. MINTAVÉTEL

A munka során 2000. április 26-án, 2002. június 6-án, 2002. október 7-én és 2004. június 4-én vettünk mintákat. A 2000. április 26-án – a Velencei-tó Lángi-tisztását szegélyező egészséges és a Nádas-tó valamint a Fürdető között található pusztuló nádasállományból (3. ábra) – gyűjtött minták esetében a *Clostridium* közösségek megismerését célzó vizsgálatokat végeztünk. Az ezt követő mintavételek kapcsán a szulfátredukáló baktérium közösségek minél teljesebb feltárása volt a cél. A fentiekkel megegyező helyekről 2002. júniusában tenyésztésen alapuló vizsgálatokhoz, 2002. októberében tenyésztéstől független denaturáló gradiens gélelektroforézisen alapuló molekuláris biológiai analízishez vettünk mintákat. 2004. júniusában a Lángi-tisztás környéki egészséges nádasállományból vettünk mintát mind tenyésztéses, mind molekuláris biológiai (klónozás) vizsgálatokhoz.



3. ábra. A Velencei-tó térképe a mintavételi helyekkel  
(Piros szín jelzi a mintavételi pontokat, zöld a nádasal borított térségeket.)

A mintavételek során a nádas rizoszférájából egy körülbelül 50 cm magas és 40 cm átmérőjű tömböt emeltünk ki, és ezzel egyidejűleg vegetációtól mentes üledékmintákat is gyűjtöttünk üledékmag mintavető (ún. core sampler) segítségével. A mintákat hűtőtáskában szállítottuk a laboratóriumba, ahol a feldolgozásuk a mintavételt követő 4 órán belül megkezdődött egy kesztyűs, automata zsiprendszerű, szabályozható termosztát szekrénnel rendelkező Thermo Scientific anaerob rendszerben (Forma 1029). A rendszerben a minták feldolgozása oxigénmentes, 5% CO<sub>2</sub>-ot, 10% H<sub>2</sub>-t, 85% N<sub>2</sub>-t tartalmazó atmoszférában történt. Az oxigénnyomok eltávolítására a rendszerben lévő anaerob gázelegy hidrogénének

segítségével került sor a cserélhető palládium-katalizátor felületén végbemenő lassú égés során. A rizoszféra tömbök belsejéből steril eszközökkel 3 és 5 grammos darabokat vágunk ki, amelyek legnagyobb részt élő gyökerekből és rizoszféra talajból álltak. Az így nyert mintákat, a gyökerek hálózataát a szorosan kapcsolódó rizoszféra talajjal együtt, tekintettük a továbbiakban a rizoszféra mintáknak. Az üledék magminták feldolgozása során a felszíni 2 cm-t eldobtuk, a további vizsgálatokhoz az alatta lévő 2-4 centiméterből vettünk 3-3 grammnyi mennyiséget.

## **6.2. TENYÉSZTÉSEN ALAPULÓ VIZSGÁLATOK**

### **6.2.1. CSÍRASZÁMBECSLÉS MOST-PROBABLE-NUMBER (MPN) TECHNIKÁVAL**

A Most-Probable-Number (MPN) technika során a kellően homogenizált mintából aerob vagy anaerob körülmények között, megfelelően megválasztott differenciáló táplevesben hígítási sorozatot készítünk addig a szintig, hogy az utolsó hígítás adott térfogatában már ne legyen jelen a keresett mikroorganizmus egyetlen sejtje sem (határhígítás). Az így kapott hígításokból azután választott számú (általában 3, 5, vagy 10, de ettől eltérő is lehet) és térfogatú párhuzamost tesztcsővekbe mérünk, és az inkubációs periódust követően hígítási fokként leolvassuk a párhuzamos pozitív csövek számát a differenciáló tápleves adta reakciónak megfelelően (Garthright, 1998). A kapott mintázat értékelése statisztikai alapon történik, vagy a kísérleti paramétereknek megfelelően definiált statisztikai táblából visszakeresve az értéket, vagy pedig egy erre szolgáló számítógépes program segítségével. Az eredmény az adott technika alapján becsülhető legvalószínűbb élőcsíraszám (MPN / térfogat, illetve tömegegység). A mi esetünkben a *Clostridium* és szulfátredukáló baktériumok legvalószínűbb élő csíraszámának becslését anaerob rendszerben, anoxikus körülmények között végeztük, decimális hígítási sort alkalmazva, a következő pontokban részletezett differenciáló táplevesek és statisztikai módszer alkalmazásával.

#### **6.2.1.1. *Clostridium*ok csíraszámbecslése**

A csíraszámbecsléshez az RMAC (Reinforced Medium for Alkalophilic Clostridia) (Karlsson és mtsai, 1988) differenciáló tápközeget választottuk. A tápleves differenciáló jellegét az adta, hogy a *Clostridium*ok növekedésük során a tápközegben lévő ciszteinnből kénhidrogént ( $H_2S$ ) szabadítanak fel, ami a jelenlévő  $Fe^{2+}$ -ionokkal fekete színű vas(II)-

sulfid (FeS) csapadékot képez. Ez a színreakció megbízhatóan jelzi a *Clostridiumok* szaporodását, ami alapján valószínűsíthető a csíraszámuk.

Az RMAC tápközeg összetétele Karlsson és mtsai (1988) alapján:

Pepton	10,0 g
Kazein	10,0 g
Élesztőkivonat	1,5 g
Húskivonat	3,0 g
Keményítő	1,0 g
Tris puffer	1,0 g
Cisztein	1,0 g
NaCl	5,0 g
4% Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	10,0 ml
7% Fe(II)-citrát	10,0 ml
Desztillált víz	1000,0 ml

20-25°C-on pH=8,0-8,5

Sterilizálás: 1 atm túlnyomás, 121°C, 15 perc

A mintákból 8-8 tagú hígítási sorozatot készítettünk úgy, hogy 27 ml tápleveshez 3 grammot adtunk a mintából, majd 15 percig vortex mixer segítségével homogenizáltuk körülbelül 2500 rpm-en. A rizoszféra minták esetében, a homogenizálást elősegítendő 1 gramm 0,1 mm átmérőjű steril üvegyöngyöt is adtunk a kiindulási szuszpenzióhoz, az üledékmintáknál ezt nem éreztük szükségesnek a minta finomszemcsés szerkezete miatt. A szuszpenziókat ezután 10 percig tartó 80°C-os hőkezelésnek vetettük alá, hogy a vegetatív sejtek elpusztításával az endospórákra szelektáljunk. A hőkezelt szuszpenziókból ezt követően 0,3 ml-t mértünk a következő 2,7 ml-nyi táplevesbe, majd újabb intenzív homogenizálás után ismét továbbmértünk 0,3 ml-t, és így tovább. A hígítási sorozat minden tagjából, így a kiindulási szuszpenzióból is 0,3 ml-t pipettáztunk egy 96 lyukú mikrotitráló lemezre, párhuzamosan 5-5 zsebbe. Az inkubálás egy hétig tartott 28°C-on. A pozitív (fekete színű) zsebek mintázataiból 6.2.1.3. szerint kiszámoltuk az MPN értékeket.

#### 6.2.1.2. Szulfátredukáló baktériumok csíraszámbeceklése

A SRB csíraszámbeceklését az előzőhöz hasonlóan végeztük, azzal a különbséggel, hogy differenciáló táplevesként Postgate's Medium B (PMB) tápközeget alkalmaztunk (Postgate, 1984). A 2002. évi mintavételekhez kapcsolódóan a mintákat előzetes hőkezelés nélkül vizsgáltuk, 2004. júniusában azonban külön-külön hígítási sorozatot készítettünk a

hőkezelt és nem hőkezelt mintákból egyaránt. Az alkalmazott táplevés differenciáló jellegét az adta, hogy a szulfátredukció következtében képződő szulfid-ionok ( $S^{2-}$ ) fekete FeS csapadékot képeznek a jelenlévő  $Fe^{2+}$ -ionokkal és a SRB jelenlétét és aktivitását ebből kifolyólag könnyen detektálhatóvá teszik. A PMB levest a tejsavat (nátrium-laktát formájában) tartalmazó eredeti változatán kívül, még vegyes savas szénforrás elegy hozzáadásával is elkészítettük, de csak a 2002. júniusában és 2002. októberében vett minták feldolgozása kapcsán. Az itt alkalmazott vegyes savas elegy a SRB különböző csoportjai által gyakran hasznosított elektron donorokat tartalmazott szénforrásként (Rabus és mtsai, 2006).

A PMB tápközeg összetétele Postgate (1984) szerint:

Na-laktát	3,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,0 g
$NH_4Cl$	1,0 g
$CaSO_4$	1,0 g
Élesztőkivonat	1,0 g
$KH_2PO_4$	0,5 g
Desztillált víz	1000,0 ml

20-25°C-on pH=7,0-7,5

Sterilizálás: 1 atm túlnyomás, 121°C, 15 perc

$FeSO_4$  oldat:

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
Desztillált víz	10,0 ml

Reduktáns oldat:

Na-tioglikolát	0,1 g
Aszkorbinsav	0,1 g
Desztillált víz	10,0 ml

Az oxidációra, illetve hőre érzékeny  $FeSO_4$  és reduktáns oldat összemérését az anaerob rendszerben végeztük, majd 0,45  $\mu m$  porúsátmérőjű baktériumszűrő (Millipore) segítségével sterilre szűrtük, és így adtuk hozzá az autoklávozott, körülbelül 60°C-os alap-tápközeghez.

Amennyiben a nátrium-laktátot vegyes savas eleggyel helyettesítettük, abból 3,1 millilitert adtunk 1000 ml táplevéshez. A vegyes savas elegy összetétele:

Tejsav	4,25 ml
Ecetsav	4,25 ml
Propionsav	1,50 ml
Vajsav	1,00 ml
izo-vajsav	0,25 ml
n-valeriánsav	0,25 ml
izo-valeriánsav	0,25 ml

Az összemért mikrotitrló lemezek inkubálása szulfátredukáló baktériumok esetében két hétig tartott 28°C-on, majd a pozitív (fekete színű) zsebek mintázatából 6.2.1.3. szerint kiszámoltuk az MPN értékeket.

### 6.2.1.3. Az MPN érték kiszámítása és statisztikai analízise

Az MPN érték kiszámításához egy előre definiált és validált Microsoft Excel® (Microsoft) munkalapot (MPN solver, version 2002.0) használtunk, ami az amerikai Food and Drug Administration (FDA) kormányhivatal alá tartozó Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) honlapján ([www.cfsan.fda.gov/~download/bam-mpn.exe](http://www.cfsan.fda.gov/~download/bam-mpn.exe)) szabadon hozzáférhető. A minta mennyiségét az egyes hígításokhoz tartozó párhuzamosan szétmért csövekben, az alkalmazott párhuzamosok számát, valamint hígítási fokként a pozitív reakciót adó párhuzamosok számát beírva a munkalap megfelelő táblázatába, az kiszámolja az MPN értéket, a hozzá tartozó 95%-os konfidencia intervallummal és az MPN érték tízes alapú logaritmusának standard hibájával együtt. A munkalap által használt számításokról és statisztikai háttérrel Garthright és Blodgett (2003) készített részletes leírást. Annak eldöntésére, hogy az egyes minták MPN értékei szignifikánsan különböznek-e egymástól, az MPN értékek tízes alapú logaritmusainak és ezek standard hibáinak ismeretében Student-féle t-próbát végeztünk (Cochran, 1950). A használt számítások:

$$\frac{\log_{10}(\text{MPN}_1) - \log_{10}(\text{MPN}_2)}{\sqrt{((\text{SD}(\log_{10}(\text{MPN}_1))^2 + \text{SD}(\log_{10}(\text{MPN}_2))^2) / (n-1))}}$$

Ahol  $\log_{10}(\text{MPN}_1)$  és  $\log_{10}(\text{MPN}_2)$  a mintákhoz tartozó MPN értékek tízes alapú logaritmusai,  $\text{SD}(\log_{10}(\text{MPN}_1))$  és  $\text{SD}(\log_{10}(\text{MPN}_2))$  az ezekhez tartozó standard hibák,  $n$  pedig a párhuzamosok száma. Az így kapott számértékre ezután a Microsoft Excel® (Microsoft) t-eloszlás függvénye segítségével (4 szabadsági fok és kétszélű eloszlás esetére) kiszámítottuk a t-eloszláshoz tartozó valószínűség értékét ( $P$ ). A vizsgált minták közötti különbséget 95%-os konfidencia szinten szignifikánsnak tekintettük, amennyiben  $P < 0,05$ .

## 6.2.2. A TENYÉSZTÉSBE VONHATÓ BAKTÉRIUMOK DÚSÍTÁSA

### 6.2.2.1. *Clostridium*ok dúsítása

A *Clostridium*ok dúsítása, majd tenyésztése a 2000. áprilisi egészséges és pusztuló nádas rizoszféra mintákból történt. A dúsítást megelőzően a mintákból 5-5 grammokat szuszpendáltunk el 5-5 ml steril vizet tartalmazó kémcsövekben, amiket ezután 10 percig tartó 80°C-os hőkezelésnek vetettünk alá, hogy a vegetatív sejteket előlésével az endospórákra szelektáljunk. Ezt követően a hőkezelt szuszpenziókat az előző nap elkészített és az anaerob rendszerben tárolt alábbi dúsító levesek 100- 100 ml-nyi térfogatába mértük (a kiindulási minta a dúsító leves körülbelül 5%-át tette ki). A *Clostridium*ok dúsítása az RCM és RMAC táplevesekben egy, a CM3 táplevesben két hétig tartott 28°C-on.

RCM (Reinforced Clostridium Medium) tápleves:

Húskivonat	10,0 g
Pepton	10,0 g
Élesztőkivonat	3,0 g
Glükóz	5,0 g
Keményítő	1,0 g
NaCl	5,0 g
Na-acetát	3,0 g
L-ciszteinium-klorid	0,5 g
Desztillált víz	1000,0 ml

20-25°C-on pH=7,0-7,5

Sterilizálás: 1 atm túlnyomás, 121°C, 15 perc

RMAC (Reinforced Medium for Alkalophilic Clostridia) tápleves 6.2.1.1. alatt részletezve.

CM3 (Cellulose Medium 3) tápleves cellulózbontó *Clostridium*okhoz

Cellulóz MN 300	9,72 g
Élesztőkivonat	2,00 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,30 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,50 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	2,90 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,00 g
CaCl <sub>2</sub>	0,15 g
Desztillált víz	1000,00 ml

Indikátor és redukciós oldat:

0,2 w/w% rezazurin oldat	1,0 ml
5,0 w/w% FeSO <sub>4</sub> oldat	25,0 µl
1,25 w/w% cisztein-hidroklorid és 1,25 w/w% Na <sub>2</sub> S·9H <sub>2</sub> O oldat	41,7 ml

20-25°C-on pH=7,5-8,0

Sterilizálás: 1 atm túlnyomás, 121°C, 15 perc

Az indikátor és redukciós oldat összemérését az anaerob rendszerben végeztük, majd 0,45 µm pórusátmérőjű baktériumszűrő (Millipore) segítségével sterilre szűrtük, és így adtuk hozzá az autoklávozott, körülbelül 60°C-os alap-tápközeghez.

#### **6.2.2.2. Szulfátredukáló baktériumok dúsítása**

A szulfátredukáló baktériumok dúsítását a 2002. és 2004. júniusi rizoszféra mintákból végeztük el. A 2002. júniusi minták esetében a dúsításhoz vegyessavas PMB táplevest használtunk. A dúsításokhoz a környezeti mintákból kivágott 5 grammos darabokat az előző nap elkészített és az anaerob rendszerben tárolt 100-100 ml-nyi táplevesekbe helyeztük (a kiindulási minta a dúsító levesek körülbelül 5%-át tette ki). A tenyészeteket 28°C-on 14-21 napig inkubáltuk. A 2002. júniusi dúsítások és a 2002. júniusi, valamint 2002. októberi csíraszámbebecslések eredményei alapján 2004. júniusában már csak tejsavas (Na-laktátos) PMB tápleveseket használtunk. Ekkor a minta számára külön dúsító leveseket nem készítettünk; a SRB dúsítása a csíraszám becslésükkel párhuzamosan, az MPN mikrotitráló lemezek zsebeibe szétmért tejsavas PMB levesekben történt.

### **6.2.3. BAKTÉRIUMTÖRZSEK IZOLÁLÁSA**

#### **6.2.3.1. *Clostridium* törzsek izolálása**

Az inkubációs periódust követően a dúsító levesekből 7 tagú, 10-es léptékű hígítási sorozatokat készítettünk. A sorozatok 5., 6. és 7. tagjából 0,1-0,1 ml-eket szélesztettünk a kiindulási táplevessel megegyező összetételű három párhuzamos (1,5% agar tartalmú) lemezre. Egy hetes, 28°C-on történő inkubáció után a lemezekről a különálló telepeket azonos összetételű ferde agarra izoláltuk. Ellenőriztük a tenyészetek tisztaságát, és a törzseket olyan táptalajon tartottuk fenn, amiről izoláltuk azokat. Az egyes törzsek jelzését a kiindulási dúsító tápleves betűjelzései és egy szám segítségével képeztük a következőképpen:

RCM leves – nincs külön jelezve, RMAC leves – „A”, CM3 leves – „C”; egészséges minta – „E”, pusztuló minta – „P”. (A CE3-as törzs ennek megfelelően az egészséges rizoszféra CM3-as dúsítójából származó 3-as számú izolátum).

### **6.2.3.2. Szulfátredukáló baktériumtörzsek izolálása**

Az inkubációs periódust követően 2002. júniusában a direkt dúsító levesekből, míg 2004. júniusában az MPN sorozatok legnagyobb hígítású pozitív (fekete) zsebeiből 6 tagú, 10-es léptékű hígítási sorozatokat készítettünk. A 2002. júniusi minták esetében a sorozatok 4., 5. és 6. tagjából 0,1-0,1 ml-eket szélesztettünk a kiindulási táplevelsel megegyező összetételű három párhuzamos, 1,5%-os agar tartalmú lemezre. 2004. júniusában a fentiek szerint elkészített hígítási tagokból a 0,1 ml-eket a megolvasztott és 45°C-ra visszahűtött 1,3%-os agar tartalmú táptalajjal együtt öntöttük Petri-csészékbe, majd a homogenizálást követően hagytuk megdermedni azokat. A tenyészeteket 28°C-os termosztátban 14 napig inkubáltuk és azt követően steril oltókaccsal 50 ml-es, megegyező összetételű PMB táplevesekbe vittük át a különálló, fekete színű telepeket. Inkubálás után újraszélesztéssel, illetve újraöntéssel ellenőriztük a tenyészetek tisztaságát. Az izolált törzseket 2002. júniusában EV és PV előtagok valamint egy szám hozzáadásával jelöltük, ahol EV az egészséges rizoszféra minta, míg PV a pusztuló rizoszféra minta vegyessavas dúsítására utalt. A 2004. júniusában izolált törzsek mind az egészséges rizoszféra mintából származtak Na-laktátos PMB táplevesben feldúsítva. Az izolátumokat ekkor az LVS (Lake Velencei Strain) előtag és egy szám hozzáadásával képeztük.

## **6.2.4. A *CLOSTRIDIUM* TÖRZSEK FENOTÍPUSOS JELLEMZÉSE**

### **6.2.4.1. Sejtmorfológiai vizsgálatok**

A sejtmorfológiai vizsgálatok során festett fénymikroszkópi preparátumokon vizsgáltuk a sejtek alakját, méretét, a sejtfal festődését Gram szerint, valamint az előforduló endospórák alakját, elhelyezkedését és méretét. Az alkalmazott festési eljárások a következők voltak:

Gram-festés (Cowan és Steel, 1974): A 24 órás tenyészetekből készített, hővel fixált keneteket 1%-os kristályibolya oldattal 1 percig festettük, majd a festéket csapvízzel leöblítettük. Ezt követően Lugol-oldattal (1,0 g jódd, 2,0 g káliumjodid, 300 ml desztillált víz) kezeltük szintén 1 percig, majd csapvízzel leöblítettük a Lugol-oldatot, és 96%-os etanollal



színtelenítettük. Az ismételt csapvizés öblítés után 1%-os szafraninnal végeztük el a kontrasztfestést 1 percig. Végül a preparátumokat, csapvizés öblítést követően levegőn hagytuk megszáradni, és fénymikroszkóppal, immerziós objektív alkalmazásával vizsgáltuk. A Gram-pozitív szervezetek kék vagy ibolya, míg a Gram-negatív szervezetek piros színűre festődtek. Az értékeléskor feljegyeztük a sejtek alakját, méretét és a sejtfal fentiek szerinti festődését.

Spóra festés (Cowan és Steel, 1974): A levegőn szárított és hővel rögzített keneteket malachitzöld festékkel szűrőpapírcsik alkalmazásával 10 percig gőzöltük, majd csapvízzel leöblítettük a preparátumokat. Ezután szafraninnal 1 percig kontrasztfestést végeztünk, amit újabb öblítés követett. Fénymikroszkóposan vizsgálva a vegetatív sejtek pirosra, az endospórák zöldre festődtek. Értékeléskor feljegyeztük a spórák alakját, elhelyezkedését, illetve a sejthez viszonyított méretét.

#### **6.2.4.2. Biokémiai tesztek**

A törzsek biokémiai profilját a következő tesztek alkalmazásával határoztuk meg. Ezek közül a kataláz teszt az endospórák Gram-pozitív *Clostridium*ok megerősítő tesztje (a *Clostridium*ok kataláz negatívak), míg az API20A biokémiai gyorsteszt a törzsek extracelluláris hidrolitikus és anyagcsere enzimeit hivatott feltérképezni.

Kataláz teszt (Cowan és Steel, 1974): A 24 órás ferde táptalajon kinőtt tenyészetek felületére 1 ml 10%-os  $H_2O_2$  oldatot cseppentettünk. Pozitív reakció esetén élénk pezsgést figyelhattunk meg, mivel az enzim által katalizált reakció nyomán  $O_2$  képződött a tenyészet felületén.

API20A anaerob biokémiai gyorsteszt (bioMérieux): Az API20A anaerob baktériumok gyors identifikációjára alkalmazott orvosi diagnosztikai eljárás. A tesztcsíkok 20 különböző szénforrást tartalmaznak dehidratált formában. Amennyiben a baktérium hasznosítja az adott szénforrást savképzés mellett, vagy hidrolitikus enzimei révén képes az alkotóelemeire bontani, azt a teszt színváltozással jelzi. A tesztben szereplő szénforrások és reakciók a következők:

TESZT	SZUBSZTRÁT	REAKCIÓ (ENZIM)	NEGATÍV REAKCIÓ	POZITÍV REAKCIÓ
IND	L-triptofán	indolképzés	sárga (1)	vörös (1)
URE	urea	ureáz	sárgás-narancs	vörös
GLU	D-glükóz	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
MAN	D-mannitol	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
LAC	D-laktóz	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
SAC	D-szacharóz	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
MAL	D-maltóz	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
SAL	szalicin	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
XYL	D-xilóz	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
ARA	L-arabinóz	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
GEL	zselatin	hidrolízis (proteáz)	nincs pigment-diffúzió	pigment-diffúzió
ESC	eszkulin	hidrolízis (alfa-glükozidáz)	sárga	barnás-fekete (2)
GLY	glicerin	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
CEL	D-cellobióz	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
MNE	D-mannóz	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
MLZ	D-melezitóz	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
RAF	D-raffinóz	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
SOR	D-szorbitol	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
RHA	D-ramnóz	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga
TRE	D-trehalóz	savképzés	bíbor	sárga – zöldes-sárga

- (1) A reakció előhívásához 1 csepp XYL reagenst adunk a zsebet lezáró paraffinolaj felületére, majd 2-3 perc után egy csepp EHR reagenst keverünk hozzá. A teszt eredményét 5 perc után lehet leolvasni.  
(2) A barnás-fekete szín a levegővel való érintkezés után fejlődik ki gyakran.

A teszt eredménye jellemző az adott mikroorganizmusra. A teszt kivitelezésekor a törzsek friss tenyészetét steril kaccsal egy ampulla API20A szintetikus minimál tápközegebe szuszpendáltuk MacFarland Standard 3-nak (bioMerieux) megfelelő sűrűségű szuszpenzió eléréséig. Ezt a szuszpenziót adagoltuk azután a tesztcsíkok egyes zsebeibe a gyártó útmutatásai szerint. A teszt eredményét 24 óráss 35°C-on anaerob körülmények között történt inkubációt követően olvastuk le szintén a gyártó útmutatásai szerint.

#### 6.2.4.3. A tesztek eredményeinek numerikus analízise

A vizsgált törzseket morfológiai és biokémiai tulajdonságaik alapján előzetesen csoportosítottuk. Összesen 23 karaktert vettünk figyelembe. Ezek a következők voltak:

Sejtmorfológiai és biokémiai vizsgálatok eredményei:

1. Gram-festés
2. Spóra-festés
3. Kataláz

#### API20A biokémiai reakciói és szénforrás hasznosításai:

- |                   |               |
|-------------------|---------------|
| 1. Indol termelés | 11. Ureáz     |
| 2. Glükóz         | 12. Mannitol  |
| 3. Laktóz         | 13. Szacharóz |
| 4. Maltóz         | 14. Szalicin  |
| 5. Xilóz          | 15. Arabinóz  |
| 6. Zselatin       | 16. Eszkulin  |
| 7. Glicerín       | 17. Cellobióz |
| 8. Mannóz         | 18. Melezitóz |
| 9. Raffinóz       | 19. Szorbitol |
| 10. Ramnóz        | 20. Trehalóz  |

A fenotípusos adatokat binárisan kódoltuk, majd STATISTICA 7.1 (StatSoft, Inc.) program segítségével osztályoztuk. Az osztályozás euklideszi távolságfüggvény (távolságmátrix) és a csoportátlag-módszer (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA, mint osztályozó algoritmus) felhasználásával készült.

Az így kapott dendrogramon a hasonlótansági skála és a törzsek fenotípusos tulajdonságainak összerendeződése alapján csoportokat alakítottunk ki (a kapcsolatok távolsága a csoportokban az euklideszi távolságmátrix alapján  $<1,5$ , az egyes csoportok távolsága:  $1,0 < <1,5$ ). A csoportokból ezt követően reprezentánsokat választottunk ki, amelyeket a továbbiakban DNS alapú, molekuláris biológiai vizsgálatoknak vetettünk alá. Az egyes csoportokból kiemelt reprezentánsok számát egyrészt a csoport mérete, másrészt a csoporton belüli fenotípusos eltérések alapján határoztuk meg. Amennyiben a csoportba tartozó fajok száma 1 és 5 között volt egy reprezentánsot választottunk ki, 6 és 10 között kettőt, 11 és 20 között hármat, 20 felett pedig négy reprezentáns került kiválasztásra úgy, hogy lehetőleg minden csoporton belüli fenotípusos eltérés képviseltesse magát.

## 6.2.5. A SZULFÁTREDUKÁLÓ BAKTÉRIUM TÖRZSEK FENOTÍPUSOS JELLEMZÉSE

### 6.2.5.1. Sejtmorfológiai vizsgálatok

Gram szerint festett fénymikroszkópi preparátumokon vizsgáltuk a sejtek alakját, méretét, a sejtfal festődését, valamint az esetlegesen előforduló endospórák alakját, elhelyezkedését és méretét. Az alkalmazott festési eljárás megegyezett a 6.2.4.1. alatt leírtakkal.

#### 6.2.5.2. Szubsztrát hasznosítási tesztek

Az API20A tesztrendszer a felhasznált szintetikus minimál tápközeg és a vizsgálatba vont szénforrások miatt különösen alkalmas *Clostridium* fajok biokémiai potenciáljának meghatározására, ugyanezen tulajdonságai miatt azonban nem megfelelő szulfátredukáló baktériumok jellemzésére és elkülönítésére. A SRB esetében ezért az alábbiakban részletezett módszerrel határoztuk meg egyes törzseink szubsztrát hasznosító képességét. Az alkalmazott módszer bonyolult volta és törzseink egy részének rendkívül lassú növekedése miatt a tesztek nem végeztük el az összes törzzsel. A szulfátredukáló törzsek elsődleges csoportosítását ezért nem fenotípusos alapon, hanem genotipizálást alkalmazva végeztük (lásd később), és csak az így kapott csoportok reprezentáns törzseinél teszteltük azok metabolikus kapacitását. A vizsgálatokat csak a 2004. júniusi mintából izolált törzseknél végeztük el.

A teszthez Widdel és Bak (1992) szintetikus táplevesét alkalmaztuk azzal a módosítással, hogy  $\text{Na}_2\text{S}$  helyett aszkorbinsavat és Na-tioglikolátot használtunk redukáló ágensként. A szintetikus tápleves alkalmazása lehetővé tette, hogy a baktériumok szaporodása és növekedése kizárólag a vizsgálandó szénforráshoz legyen köthető; a disszimilatorikus szulfátredukációt pedig a táplevesben megjelenő szulfid ionok kimutatásával igazoltuk. Ez utóbbi miatt volt szükség a redukáló ágens cseréjére, a PMB tápleves esetében is alkalmazott aszkorbinsavra és Na-tioglikolátra.

A tápleves összetétele Widdel és Bak (1992) szerint:

Alap tápközeg

NaCl	1,0 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{Na}_2\text{SO}_4$ (vagy nem kerül bele*)	4,0 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,25 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2 g
KCl	0,5 g
Desztillált víz	1000 ml

#### Nyomelem oldat

FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2100 mg
(FeCl <sub>3</sub> ·4H <sub>2</sub> O*)	(1500 mg*)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	100 mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	190 mg
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	24 mg
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	144 mg
(ZnCl <sub>2</sub> *)	(68 mg*)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	36 mg
HCl 25% (7,7M)	12,5 ml
Desztillált víz	987 ml

#### Szelenit-wolframát oldat

NaOH	0,4 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	6,0 mg
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8,0 mg
Desztillált víz	987,0 ml

#### Nátrium-hidrogénkarbonát oldat

NaHCO <sub>3</sub>	84 g
Desztillált víz	1000 ml-ig

#### Vitamin oldat

4-aminobenzoesav	4 mg
D(+)-Biotin	1 mg
Nikotinsav	10 mg
Kálcium-pantotenát	5 mg
Piridoxin-dihidroklorid	15 mg
Nátrium-foszfát puffer	100 ml
10 mM; pH 7,1	

#### Tiamin (B<sub>1</sub>-vitamin) oldat

Tiamin-klorid-dihidroklorid	10 mg
Nátrium-foszfát puffer	100 ml
25 mM; pH 3,4	

#### B<sub>12</sub>-vitamin oldat

Cianokobalamin	5 mg
Desztillált víz	100 ml

#### Reduktáns oldat

Na-tioglikolát	0,1 g
Aszkorbinsav	0,1 g
Desztillált víz	10 ml

\* A zárójelbe tett és csillaggal jelölt alkotók a szulfátos sók alternatívái arra az esetre, ha szigorúan szulfátmentes táplevest akarunk készíteni.

Az egyes oldatokat külön-külön sterilizáltuk. A vitamin oldatokat és a reduktáns oldatot membránszűrőssel (0,2  $\mu$ m), az alap tápközeget és a többi oldatot autoklávozással (1 atm túlnyomás, 121°C, 15 perc) sterilizáltuk. Az autoklávozandó oldatokat szorosan zárt üvegekben, körülbelül 1/3-nyi szabad gáztér (általában  $N_2$ ; a nátrium-hidrogénkarbonát oldat esetében  $CO_2$ ) mellett autoklávoztuk. A sterilizált oldatokat a következők szerint mértük össze:

Alap tápközeg	955 ml
Nyomelem oldat	1,0 ml
Szelenit-Wolframát oldat	1,0 ml
Nátrium-hidrogénkarbonát oldat	30,0 ml
Vitamin oldat	1,0 ml
Tiamin ( $B_1$ -vitamin) oldat	1,0 ml
$B_{12}$ -vitamin oldat	1,0 ml
Reduktáns oldat	10,0 ml

A tápleves pH-ját ezt követően 7,0-7,3 közötti értékre állítjuk steril 1 M  $H_2SO_4$  vagy 1 M  $Na_2CO_3$  oldatok adagolásával. Amennyiben szulfátmentes táplevest készítünk, a pH állításhoz 1 M  $H_2SO_4$  helyett 2 M HCl oldatot használunk.

A szénforrás hasznosítás vizsgálatához a kész táplevest csavaros kupakos csövekbe mértük szét, majd ezt követően a vizsgált szubsztrátokat membránszűrőssel sterilizált törzsoldatokból adtuk hozzá 10 mM végső koncentrációban (1 M törzsoldatok, pH 7,0-7,3; 0,1 ml törzsoldat / 10 ml tápleves). Az így előkészített tesztcsöveket azután az egyes törzsek 0,1-0,1 ml aktívan növe PMB leves tenyészetével oltottuk be. A növekedésnek indult tenyészeteket ezt követően háromszor egymás után ugyanazon elektron donort (szénforrást) tartalmazó friss táplevesekbe passzáltuk át, hogy a sejtek növekedése ne a kiindulási PMB táplevesből bekerülő maradék laktátnak legyen köszönhető. A fentiekkel párhuzamosan elkészítettük a táplevesünk szulfátmentes változatát is (az alternatív nem szulfátos sók a receptúrában \*-gal jelölve), baktérium törzseink fermentációs képességeinek vizsgálatához.

A törzsek növekedését az adott szénforrás jelenlétében a harmadik átoltást követő 14 napos 28°C-on történő inkubáció után vizsgáltuk a kontroll csővel (tápleves szénforrás nélkül, a baktérium szuszpenzióval inokulálva és továbboltva) összehasonlításban. Ekkor történt meg a disszimilatorikus szulfátredukció megerősítése is. Ennek során a szulfát-tartalmú táplevesekhez  $\text{FeSO}_4$  oldatot (5 mM) adtunk és a kontroll csővel összehasonlításban figyeltük az esetlegesen kiváló fekete  $\text{FeS}$  csapadékot, a szulfátredukció indikátorát.

### **6.3. A TENYÉSZTETT TÖRZSEK VIZSGÁLATA MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL**

A kitenyésztett törzseket faji szinten 16S rRNS génjeik (16S rDNS) szekvencia analízise alapján határoztuk meg. Ennek során az izolált genomi DNS megfelelő szakaszát polimeráz láncreakcióban (PCR) felszaporítottuk, majd az így kapott PCR terméket a jelölt terminátorú ciklikus szekvenálás módszerével és automata szekvenátorral szekvenáltuk. Mivel a különböző törzsek részben ugyanazon fajhoz is tartozhatnak, a vizsgálatokat megelőzően a valószínűsíthetően identikus törzseket csoportokba foglaltuk, és csak választott csoportrepresentánsok esetében végeztünk szekvenálást. A *Clostridium* törzsek előzetes csoportosítását fenotípusos tulajdonságaik alapján végeztük el (6.2.4. pont), majd ezt követte a fenotípusosan identikus törzsek genotipizálása a 16S rDNS restrikciós emésztési mintázata (RFLP) alapján. A SRB törzsek esetében a csoportosításhoz nem alkalmaztuk az esetükben körülményes szubsztrát hasznosítási teszteket (6.2.5.2. pont), hanem kizárólag genotípusos alapon történt a csoportokba rendezés. A megfelelő felbontás eléréséhez azonban a kétenzimes RFLP analízist nem csupán a 16S rDNS-en, hanem a szulfátredukálókra specifikus disszimilatorikus szulfit reduktáz génjén (*dsrAB*) is elvégeztük. A mindkét génre és mindkét enzimre megegyező hasítási mintázatot mutató törzsek közül választottunk ezután csoport representánst, amelyeken elvégeztük a szubsztrát hasznosítási teszteket és részlegesen megszekvenáltuk mind a 16S rDNS-t, mind a *dsrA* gént.

#### **6.3.1. GENOMIÁLIS DNS KINYERÉSE ÉS TISZTÍTÁSA BAKTÉRIUMTÖRZSEKBŐL**

A genomiális DNS kinyerését és tisztítását a Mikrobiológiai Tanszéken rendelkezésre álló módszerek és kitek segítségével végeztük. Ez a 2000. áprilisi mintából izolált *Clostridium* törzsek esetében Rainey és mtsai (1996) módszerét jelentette, míg a 2002. és 2004. júniusi mintákból származó SRB törzseknél a Bacterial Genomic DNA Mini-prep Kit

(V-gene) alkalmazását. Az egyes módszerek eredményességüket tekintve nem különböztek egymástól, választásunk az aktuális laboratóriumi gyakorlat szerint történt.

#### **6.3.1.1. A DNS-izolálás és tisztítás menete Rainey és mtsai (1996) alapján**

- Egy 1,5 ml-es Eppendorf-csőben, 400 µl NaCl-EDTA pufferben (0,15 M NaCl, 0,01 M EDTA Na-sója, pH 8,0) egy kacsnyi, az adott törzsnek megfelelő szilárd agar táptalaj felületéről felszedett, 24 órás (lassabban növvő szulfátredukáló baktériumok esetében 72-120 órás) baktériumtömeget homogenizáltunk el.
- 10 µl lizozim oldatot (10 mg/ml) adtunk hozzá, vortexeltük, majd 30 percig 37°C-on vízfürdőben inkubáltuk.
- 5 µl Proteináz-K-t (10 mg/ml) és 10 µl SDS-t (sodium-dodecyl-sulphate; 25% w/V) adtunk hozzá, vortexeltük és tovább inkubáltuk 60°C-on 30 percig.
- A mintákat extraháltuk 400 µl TRIS/EDTA-val telített fenol hozzáadásával, majd vortexelés után 4°C-on, 14000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk.
- A felülúszó vizes fázist egy új 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe vittük át, és 400 µl kloroform hozzáadásával extraháltuk, majd vortexelés után 4°C-on, 14000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk.
- A felülúszó vizes fázisból 300 µl-t egy újabb 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe vittünk át, majd a Prep-A-Gene kit (Bio-Rad) segítségével tisztítottuk tovább az alábbiak szerint:
- 1,0 ml Prep-A-Gene DNA Binding Buffert, majd 10 µl Prep-A-Gene mátrixot hozzáadva, kíméletes rázatás után 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten.
- 1 perces 14000 rpm-en való centrifugálás után óvatosan elöntöttük a felülúszót, majd 500 µl Prep-A-Gene Binding Buffert adtunk a mátrixhoz, vortexelés és 1 perces, 14000 rpm-en történő centrifugálást követően ismét eltávolítottuk a felülúszót.
- 750 µl Prep-A-Gene Wash Buffert adtunk a csapadékhoz, majd vortexelés és 1 perces, 14000 rpm-en történő centrifugálás után eltávolítottuk a felülúszót, majd ezt a lépést megismételtük.
- A mintát újból centrifugáltuk 1 percig 14000 rpm-en, majd a maradék Wash Buffert pipettás leszívással eltávolítottuk.
- 50 µl HPLC tisztaságú, steril víz hozzáadása és enyhe felrázás után 15 percig 37°C-on inkubáltuk mintáinkat, majd 2 percig 13000 rpm-en centrifugáltuk.
- 40 µl felülúszót átvittünk egy újabb Eppendorf csőbe és 4°C-on tároltuk.



A baktériumok vastag sejtfalának emésztését lizozimmal értük el, ami a peptidoglikánban az N-acetil-muraminsav és az N-acetil-glükóz-amin közötti  $\beta(1-4)$  kötéseket hasítja. Az SDS detergens, a sejtmembránt degradálja. A Proteináz-K szerepe a sejtekből kiszabaduló DNázok és fehérjetermészetű PCR inhibitorok emésztése, inaktiválása. A klasszikus fenol-kloroformos tisztítás nem eredményez mindig kellő tisztaságú terméket, ezért alkalmaztuk a Prep-A-Gene kitet, ahol egy szilikát alapú mátrix magas nátrium-perklorát tartalmú pufferben szelektíven köti a DNS-t, amit később  $\text{dH}_2\text{O}$ -zel oldunk vissza.

### **6.3.1.2. A DNS-izolálás és tisztítás menete Bacterial Genomic DNA Mini-prep Kit (V-gene) alkalmazásával**

A kit alkalmazása során mindenben a gyártó által adott protokoll szerint jártunk el. A kiindulási sejtömeg ezúttal is körülbelül egy kacsnyi szilárd táptalaj felületéről származó baktérium tenyészetet jelentett.

### **6.3.1.3. A tisztított DNS detektálása agaróz gélelektroforézissel:**

- 1%-os agaróz gél (Gibco) készítettünk, (1 g agaróz, 10 ml 10xTBE, 90 ml HPLC tisztaságú víz, 5  $\mu\text{l}$  etidium-bromid oldat).
- 5  $\mu\text{l}$  DNS mintát és 3  $\mu\text{l}$  gél töltőpuffert (30% (V/V) glicerín, 0,25 mM brómfenolkék) kevertünk össze, majd a zsebekbe töltöttük. Molekula méret markerként 1,2  $\mu\text{l}$   $\lambda$  fág EcoRI és HindIII restrikciós enzimekkel hasított DNS-ét (Fermentas) használtunk.
- 15 percig 100 V-on futtattuk a gél a 1xTBE pufferben (107,8 g/l TRIS, 55 g/l bórsav, 7,4 g/l EDTA, pH 8,3), majd transzilluminátort használva megfigyeltük a DNS-t a gélben.

## **6.3.2. SPECIÁLIS DNS SZAKASZOK FELSZAPORÍTÁSA POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓVAL (PCR)**

A *Clostridium* és SRB törzsek 16S rDNS régiójának felszaporításához Taq polimerázt és 27f elnevezésű forward, valamint 1492r elnevezésű reverz általános Bacteria primereket használtunk. Ezen túlmenően a szulfátredukáló törzseknél elvégeztük a *dsrAB* gén felszaporítását is DSR1F forward és DSR4R reverz primerek segítségével. Az alkalmazott primerek szekvenciáit és hivatkozásait az 1. táblázat tartalmazza.

Primer	Szekvencia (5' – 3' irányban)	Hivatkozás
16S rDNS primerek 27f 1492r 519r	GAG TTT GAT CCT GGC TCA TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T GWA TTA CCG CGG CKG CTG	Lane (1991)
<i>dsrAB</i> primerek DSR1F DSR4R	ACS CAC TGG AAG CAC G GTG TAG CAG TTA CCG CA	Wagner és mtsai (1998)

1. táblázat. Az egyes PCR reakciókban felhasznált primerek szekvenciái és hivatkozásai  
(S: G vagy C, Y: C vagy T, W: A vagy T)

Az egyes PCR reakciók összemérése és az adott reakció hőprofiljának megválasztása az alábbiak szerint történt:

Felhasznált reagensek:

- 10xPCR puffer (Fermentas) (200 mM TRIS/HCl, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM KCl)
- MgCl<sub>2</sub> oldat (Fermentas) (25 mM)
- dNTP keverék (Fermentas) (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP)
- 27f primer (Bio-Science) (3,25 x 10<sup>-4</sup> M) / 1492r primer (Bio-Science) (3,25 x 10<sup>-4</sup> M)
- DSR1F (Bio-Science) (3,25 x 10<sup>-4</sup> M) / DSR4R (Bio-Science) (3,25 x 10<sup>-4</sup> M)
- dH<sub>2</sub>O
- Taq polimeráz LC (Fermentas) (Low Concentrated, 1 U/μl)

Amennyiben több reakciót végeztünk egymással párhuzamosan, úgy a komponensekből egy Eppendorf csőbe mérve premixet készítettünk a reakciók számának megfelelő mennyiségben. Ezt alaposan vortexeltük, lecentrifugáltuk, majd 0,2 ml-es reakciócsövekbe mértük szét. Ezekhez adtuk hozzá a templát DNS-t, amelynek szükséges mennyiségét az agaróz gélelektroforézist követően állapítottuk meg. A reakciócsöveket ismét alaposan vortexeltük és lecentrifugáltuk. A mintákat ezután Biometra T Personal PCR készülékbe helyeztük és elindítottuk a reakciót. A teljes genomiális DNS denaturálásához szükséges hőmérsékletet az általunk használt Taq polimeráz számára túl magas, így azt csak első lépés után adtuk a reakcióhoz.

A 16S rDNS régió felszaporítása:

A PCR reakció összetétele:

10x PCR puffer	5 µl	priminek összeméve
MgCl <sub>2</sub>	3 µl	
dNTP	10 µl	
27f	0,5 µl	
1492r	0,5 µl	
dH <sub>2</sub> O	25 - 28 µl	
DNS templát	2-5 µl	
Taq pol. (1 U/µl)	1 µl	
Összesen	50 µl	

A PCR reakció hőprofilja:

Kezdeti denaturáció	98°C	5 perc	32x
Taq polimeráz bemérése	94°C	10 mp	
Denaturáció	94°C	30 mp	
Anelláció	52°C	30 mp	
Extenzió	72°C	1 perc	
Végző extenzió	72°C	10 perc	
Hűtés	4°C	∞	

A *dsrAB* régió felszaporítása:

A PCR reakció összetétele:

10x PCR puffer	5 µl	priminek összeméve
MgCl <sub>2</sub>	3 µl	
dNTP	10 µl	
DSR1F	0,5 µl	
DSR4R	0,5 µl	
dH <sub>2</sub> O	24,5-27,5 µl	
DNS templát	2-5 µl	
Taq pol. (1 U/µl)	1,5 µl	
Összesen	50 µl	

A PCR reakció hőprofilja:

Kezdeti denaturáció	98°C	5 perc	38x
Taq polimeráz bemérése	94°C	10 mp	
Denaturáció	94°C	45 mp	
Anelláció	54°C	45 mp	
Extenzió	72°C	90 mp	
Végző extenzió	72°C	10 perc	
Hűtés	4°C	∞	

A *dsrAB* gén felszaporításához hosszabb PCR ciklusidőket (hosszabb denaturáció, anelláció és extenzió) és magasabb ciklusszámot alkalmaztunk, mert viszonylag hosszú génszakasról (~1,9 kb) volt szó. Ennek megfelelően megnöveltük a hőérzékeny Taq polimeráz mennyiségét is (1,5 U / reakció), hogy az a reakció végén is még megfelelő enzimaktivitást mutasson.

A kapott termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével detektáltuk, ugyanúgy, mint az izolált genomiális DNS-t. A PCR termékek tisztítása a 2000. áprilisi minta esetén Prep-A-Gene kittel történt a genomi DNS izolálással megegyező módon, azzal a különbséggel, hogy itt az első lépésben csak 350 µl DNA Binding Buffert használtunk. A 2002. és 2004. júniusi minták esetében a tisztításhoz már a PCR-M Clean Up System-et (Viogene) használtuk mindenben a gyártó útmutatásainak megfelelően. Ez utóbbi rendszer

esetében a DNS-t kötő szilika mátrix egy centrifuga cső köztes szűrőmembránjában került elhelyezésre, ezáltal a tisztítandó DNS darabok adszorbeálása hiperozmotikus közegből, mosása alkoholos mosófolyadékkal és végül visszaoldása steril, HPLC tisztaságú vízbe egymást követő centrifugálási lépések sorozataként történt.

### 6.3.3. A PCR TERMÉKEK RFLP ANALÍZISE

Ez a módszer a DNS restrikciós enzimekkel való hasításából származó különböző méretű szakaszok mintázatának az összehasonlítására alkalmas (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP).

Az RFLP analízis során kétféle restrikciós enzimet használtunk a gyártó által hozzájuk ajánlott pufferekkel (AluI és Hin6I, Y/TANGO Buffer, Fermentas). A 0,6 ml csövekbe az alábbi összetételű premixeket mértük bele, végig jégén tartva az oldatokat:

Premix:

2,5 µl Y/TANGO puffer

15,2 µl HPLC tisztaságú víz

0,3 µl enzim (AluI vagy Hin6I)

7,0 µl DNS mintánként

A csöveket vortexeltük és lepörgetés után 3 órán át 37°C-os vízfürdőben tartottuk. A minták kiértékelése ezt követően agaróz gélelektroforézissel történt a következők szerint:

- 1,5%-os agaróz gél (1,5 g agaróz, 10 cm<sup>3</sup> 10xTBE puffer, 90 cm<sup>3</sup> bidesztillált víz 5 µl etídium bromid)
- 10 µl DNS mintát és 4 µl töltőpuffert (30 V/V% glicerín, 0,25 mM brómfenolkék) kevertünk össze és a zsebekbe töltöttük.
- 1 óra 10 percig 80 V-on futtattuk a gél
- Transzilluminátor segítségével megfigyeltük a DNS-t a gélben

Az azonos hasítási mintázatú csoportokat (RFLP csoportok) manuális ellenőrzéssel alakítottuk ki. A szulfátredukáló baktériumok 16S rDNS és *dsrAB* RFLP csoportjaiból (a továbbiakban, mint 16S-RFLP és *dsr*-RFLP csoportok) egy reprezentatív tagot választottunk ki szekvenálásra. A *Clostridium* 16S-RFLP csoportjai esetében azonban figyelembe vettük

az előzetes fenotípusos csoportosítás eredményét is és ennek megfelelően választottunk csoportrepresentánsokat.

### **6.3.4. A FELSZAPORÍTOTT DNS SZAKASZOK SZEKVENÁLÁSA**

A PCR termékek szekvenálását a jelölt terminátorú ciklikus szekvenálás (Dye Terminator Cycle Sequencing, Perkin Elmer, 1998) módszerével és ABI PRISM 310 automata szekvenátorral (Perkin Elmer) végeztük el.

#### **6.3.4.1. Szekvenáló reakciók**

Az egyes szekvenáló PCR reakciók összemérése és az adott reakció hőprofiljának megválasztása az alábbiak szerint történt:

Felhasznált reagensek:

- Big Dye Terminator Ready Cycle Sequencing Kit AmpliTaq DNS polimerázzal (Perkin Elmer), a kit már összemérve tartalmazza a reakcióhoz szükséges nukleotidokat (dNTP keverék megfelelő mennyiségű fluoreszcens festékkel jelölt dideoxi-nukleotiddal elegyítve), a  $MgCl_2$ -ot, valamint egy speciálisan módosított Taq polimerázt (AmpliTaq), ami megfelelő affinitással építeti be a jelölt dideoxi-nukleotidokat is.
- Big Dye Terminator Ready Cycle Sequencing Kit hígító puffere (Perkin Elmer)
- 519r primer (Bio-Science) ( $3,25 \times 10^{-4}$  M)
- DSR1F primer (Bio-Science) ( $3,25 \times 10^{-4}$  M)
- $dH_2O$

Mivel több reakciót végeztünk párhuzamosan, a komponenseket egy Eppendorf csőbe mérve premixet készítettünk. Ezt alaposan vortexeltük, lecentrifugáltuk, majd 0,2 ml-es reakciócsövekbe mértük szét. Ezekhez adtuk hozzá a megtisztított, szekvenálásra kész PCR terméket. A reakciócsöveket ismét alaposan vortexeltük és lecentrifugáltuk. A mintákat ezután Biometra T Personal PCR készülékbe helyeztük és elindítottuk a reakciót.

A 16S rDNS régió részleges szekvenálása:

A PCR reakció összetétele:

Big Dye	2 µl	premixnek összesenve
Big Dye puffer	3 µl	
dH <sub>2</sub> O	9 µl	
519r	1 µl	
Templát PCR	5 µl	

A PCR reakció hőprofilja:

Denaturáció	96°C	10 mp	28x
Anelláció	50°C	5 mp	
Extenzió	60°C	4 perc	
Hűtés	4°C	∞	

A *dsrAB* régió részleges szekvenálása:

A PCR reakció összetétele:

Big Dye	4 µl	premixnek összesenve
Big Dye puffer	4 µl	
dH <sub>2</sub> O	3 µl	
519r	1 µl	
Templát PCR	8 µl	

A PCR reakció hőprofilja:

Denaturáció	96°C	20 mp	28x
Anelláció	50°C	10 mp	
Extenzió	60°C	4 perc	
Hűtés	4°C	∞	

A *dsrAB* régió részleges szekvenálása esetén megemelt denaturációs és anellációs időket alkalmaztunk, mivel a templátként szolgáló *dsrAB* PCR termék viszonylag hosszú volt. Ezzel párhuzamosan megemeltük a Big Dye Terminator Ready Cycle Sequencing Kit mennyiségét is, hogy a szekvenáló reakció a megváltoztatott hőprofil mellett is biztonságosan végigmenjen.

#### 6.3.4.2. A szekvenáló reakció termékének tisztítása:

- A 0,6 ml-es Eppendorf-csőbe az alábbi elegyet mértük:
  - 3 µl 3 M Na-acetát (pH=4,6)
  - 62,5 µl 95%-os etanol
  - 14,5 µl HPLC tisztaságú steril víz
- 20 µl szekvenáló reakció terméket pipettáztunk bele és vortexeltük.
- Ezután 25 percig állni hagytuk szobahőmérsékleten, majd 20 percig centrifugáltuk 14000 rpm-en. A felülúszót óvatosan leszívtuk pipettával és előntöttük.
- 250 µl 70%-os etanollal mostuk a csapadékot, vortexeltük, majd 10 perces centrifugálás következett.
- A felülúszót óvatosan leszívtuk pipettával, majd vákuumcentrifugában 15 perc alatt beszárítottuk a csapadékot.

#### **6.3.4.3. A szekvenáló reakció termékének futtatása ABI PRISM 310 automata szekvenátoron (Perkin Elmer)**

- A beszárított terméket 17 µl TSR-pufferbe vettük fel, és a gyártó által megadott protokoll szerint denaturáltuk, majd futtattuk le. Az adatgyűjtést és feldolgozást az ABI PRISM 310 szekvenáló készülékkel végeztük el.
- A kapott szekvenciák alapján a legközelebbi rokon fajokat és azokhoz viszonyított százalékos hasonlósági értékeket a BLAST ([www.ncbi.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST)) adatbázis segítségével kerestük meg (Altschul és mtsai, 1997). Ezt követően a 16S rDNS szekvenciákat az ARB (Strunk és mtsai, 1998), a *dsrAB* szekvenciákat pedig a MEGA2 programcsomag (Kumar és mtsai, 2001) segítségével illesztettük és analizáltuk. Az evolúciós távolságok számításához Kimura modelljét (Kimura, 1980), a filogenetikai fák készítéséhez Saitou és Nei (1987) neighbour-joining módszerét alkalmaztuk.

### **6.4. SZULFÁTREDUKÁLÓ BAKTÉRIUMOK KIMUTATÁSA TENYÉSZTÉSTŐL FÜGGETLEN MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZERREL**

Az általunk választott módszerek során a célunk nem a mikrobiális közösség egészének a megismerése volt, hanem célzottan a szulfátredukáló baktériumok közösségi összetételének a feltárása. A kitűzött cél eléréséhez minden alkalommal a rizoszféra mintából közvetlenül izolált közösségi DNS-ből indultunk ki. Ebből a 2002. októberi minta esetében az adott környezetben feltehetőleg leggyakoribb SRB csoportra, a *Desulfovibrio* – *Desulfomicrobium* csoport tagjaira specifikus PCR reakciókkal szaporítottuk fel azok 16S rDNS-ének meghatározott szakaszait. Ezt követően az egyes fajokra jellemző szekvenciákat denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) technika segítségével választottuk szét. A 2004. júniusi mintavételt követően más utat választottunk. Ekkor az izolált közösségi DNS-ből a szulfátredukálóra specifikus disszimilatórikus szulfít reduktáz gént szaporítottuk fel, majd az egyes fajokra jellemző génszakaszokat klónozással választottuk el egymástól, amit a már szeparált szakaszok szekvenálása és azonosítása követett.

#### **6.4.1. DNS IZOLÁLÁS A RIZOSZFÉRA MINTÁBÓL**

A rizoszféra mintából közösségi DNS-t a 2002. októberi és 2004. júniusi mintavételeket követően izoláltunk. A DNS izolálásához és tisztításához a FastDNA SPIN kit

for Soil rendszert (BIO 101, Qbiogene) használtuk a gyártó útmutatásainak megfelelően. A kit által alkalmazott módszer alapja, hogy a mintát (esetünkben nedves tömegre számolva 200 mg-ot) a mellékelt oldatokból összeállított lízis pufferben kerámia- és szilika-göngyöökkel összeeráztva (Retsch MM 301 sejtmalom, frekvencia: 20 1/s, 30 sec), az abban található sejteket feltártuk. Ezt követte a fehérjék kicsapása megfelelő reagens hozzáadásával. A centrifugálási lépést (14000 g, 5 perc) követően kapott fehérjementes felülúszóból a DNS tisztítása szilika mátrixra való adszorbeálással, mosással, majd visszaoldásával történt. Az izolált közösségi DNS-t agaróz gélelektroforézis segítségével detektáltuk, ugyanúgy, mint a törzseink genomiális DNS-ét.

#### **6.4.2. A *DESULFOVIBRIO* – *DESULFOMICROBIUM* CSOPORT TAGJAINAK SPECIFIKUS KIMUTATÁSA DGGE SEGÍTSÉGÉVEL**

##### **6.4.2.1. *Desulfovibrio* – *Desulfomicrobium* csoport felszaporítása specifikus primerek alkalmazásával**

Az izolált DNS-ből a vizsgálathoz szükséges csoport specifikus szakaszokat ún. „nested” PCR segítségével szaporítottuk fel. Ennek során először a teljes 16S rDNS-t sokszorozítottuk általános Eubacteria primerekkel (27f és 1492r) a tiszta törzseknél leírtakkal (6.3.2.) megegyező módon. Ezzel a számunkra fontos SRB 16S rDNS szakaszait is felszaporítottuk olyan mennyiségben, ami már elegendőnek bizonyult a második PCR számára. Az így felszaporított 16S rDNS keverék szolgált templátként a „nested” PCR-ben, amelyet már a templát szekvencia belsőbb régióihoz kötődő csoport specifikus primerekkel (DSV230f és DSV838r) végeztünk.

A felhasznált reagensek megegyeztek a korábbi PCR reakcióknál leírtakkal (6.3.2.), az alkalmazott primer pár kivételével, amelyik itt a következő volt:

- DSV230f primer (Bio-Science) ( $3,25 \times 10^{-4}$  M)
- DSV838r primer (Bio-Science) ( $3,25 \times 10^{-4}$  M)

A primerek szekvenciáit és hivatkozásait a 2. táblázat tartalmazza. Ez a primer pár a *Desulfovibrio* – *Desulfomicrobium* csoport 16S rDNS-ének belső szakaszát szaporítja fel. Mivel az alkalmazott primerek több ponton degeneráltak, azaz szekvenciájukban ugyanazon pontokon különböző bázisok fordulnak elő, a biztos és pontos anelláció érdekében nagyobb primerkoncentrációt, hosszabb anellációs időt és magasabb anellációs hőmérsékletet alkalmaztunk, mint a 16S rDNS PCR esetében. Ebben a reakcióban a templát DNS molekula



is rövidebb volt (< 1500 bp), ezért alacsonyabb, 96°C-os kezdeti denaturációs hőmérséklet is elegendő volt. Emiatt a Taq polimerázt károsodás nélkül előre belemérhettük a premixbe.

Primer	Szekvencia (5' – 3' irányban)	Hivatkozás
DSV230f	GRG YCY GCG TYY CAT TAG C	Daly és mtsai (2000)
DSV838r	SYC CGR CAY CTA GYR TYC ATC	

2. táblázat. A *Desulfovibrio* – *Desulfomicrobium* csoport felszaporításához használt

16S rDNS primerek szekvenciái és hivatkozásai (S: G vagy C, R: G vagy A, Y: C vagy T)

A PCR reakció összetétele:

10x PCR puffer	5 µl	premixnek összemérve
MgCl <sub>2</sub>	3 µl	
dNTP	10 µl	
DSV230f	1 µl	
DSV838r	1 µl	
Taq pol. (1 U/µl)	1 µl	
dH <sub>2</sub> O	27 µl	
DNS templát	2 µl	
Összesen	50 µl	

A PCR reakció hőprofilja:

Kezdeti denaturáció	96°C	3 perc	32x
Denaturáció	94°C	30 mp	
Anelláció	58°C	1 perc	
Extenzió	72°C	1 perc	
Végső extenzió	72°C	10 perc	
Hűtés	4°C	∞	

A kapott termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével detektáltuk, ugyanúgy, mint a tiszta törzsekből izolált genomiális DNS-t. A PCR termék tisztításához a PCR-M Clean Up Systemet (Viogene) használtuk a gyártó útmutatásainak megfelelően. A tisztított PCR terméket 40 µl dH<sub>2</sub>O-ban vettük fel.

#### 6.4.2.2. GC-kapcsos PCR termékek létrehozása DGGE analízishez

A DGGE számára, az irodalmi áttekintésben már részletezett okokból, GC-kapcsos PCR termékeket kellett létrehozunk. Ehhez az előbbi PCR reakció termékét használtuk templátként egy „semi-nested” PCR összeállításakor. A reakció „semi-nested” jellegét az adta, hogy csak az egyik primer (SRB385f-GC) illeszkedett belsőbb szekvencia szakaszra, a másik ugyanaz volt, mint az előző reakció során (DSV838r). A PCR hőprofilján is változtattunk és lépésenként csökkenő anellációs hőmérsékletű reakciót használtunk. Ennek során viszonylag magas primer anellációs hőmérsékleten indítottuk a reakciót, majd 20 cikluson keresztül folyamatosan csökkentettük az anellációs hőmérsékletet (-0,5°C/ciklus),

végül egy adott hőmérsékleten futtattuk le a maradék ciklusokat. Így az első néhány ciklusban csak kevesebb, de specifikus termék keletkezett. Ezután mikor már elegendő specifikus templát állt rendelkezésre, az alacsonyabb hőmérséklet a hatékonyabb és gyorsabb primerkötődést szolgálja. (Ha rögtön alacsony hőmérsékleten kezdenénk az amplifikációt, nagyobb valószínűséggel keletkeznének nem specifikus termékek, sőt a még nagy koncentrációban jelen lévő GC-kapcsoló primer önmagával is hibridizálna, ezáltal gátolná a további amplifikációt.)

A felhasznált reagensek megegyeztek a korábbi PCR reakcióknál leírtakkal, az alkalmazott primer pár kivételével, amelyik itt a következő volt (2. és 3. táblázat):

- SRB385f-GC primer (Bio-Science) ( $3,25 \times 10^{-4}$  M)
- DSV838r primer (Bio-Science) ( $3,25 \times 10^{-4}$  M)

Primer	Szekvencia (5' – 3' irányban)	Hivatkozás
SRB385f	CCT GAC GCA GCG ACG CCG	Amann és mtsai, 1990
SRB385f-GC	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA GGG GGG CCT GAC GCA GCG ACG CCG	Muyzer és mtsai, 1997

3. táblázat. A DGGE futtatást megelőző, valamint a gélből kivágott csík DNS tartalmát felszaporító PCR reakciókban használt 16S rDNS primerek szekvenciái és hivatkozásai

A PCR reakció összetétele:

10x PCR puffer	5 µl	primixnek összenéve
MgCl <sub>2</sub>	3 µl	
dNTP	10 µl	
SRB385f-GC	1 µl	
DSV838r	1 µl	
Taq pol. (1 U/µl)	1 µl	
dH <sub>2</sub> O	28 µl	
DNS templát	1 µl	
Összesen	50 µl	

A PCR reakció hőprofilja:

Kezdeti denaturáció	96°C	3 perc	20x
Denaturáció	94°C	30 mp	
Anelláció	64°C ↓ 54°C	1 perc	
Extenzió	72°C	45 mp	
Denaturáció	94°C	30 mp	26x
Anelláció	54°C	1 perc	
Extenzió	72°C	45 mp	
Végző extenzió	72°C	10 perc	
Hűtés	4°C	∞	

#### 6.4.2.3. A DGGE optimalizálása tiszta törzsek genomális DNS-ének felhasználásával

Mivel az előzőekben részletezett módon előállított PCR termékeket korábban még nem alkalmazták DGGE analízisben, szükségesnek láttuk az elektroforézis körülményeinek optimalizálását. Ehhez tiszta törzseink genomális DNS-éből a fentiek szerint előállított GC-kapcsos PCR termékeket (SRB385f-GC – DSV838r) kevertünk össze, így modellezve a környezeti mintát. A felhasznált tiszta tenyészetek egyrészt a 2002. júniusi mintából (EV5 jelzésű törzs), másrészt egy korábbi munkánkból (S14; Borsodi és mtsai, 2003) származtak. A DGGE optimalizálását két lépésben végeztük. Először az elektroforézis irányára merőleges koncentráció-gradiensű gélben futtattuk a PCR termékeket. Így tudtuk meg, hogy mely denaturáló koncentrációknál a legoptimálisabb a szétválás. A második lépésben a futási iránnyal párhuzamos koncentráció-gradiensű gélt öntöttünk a fentebb kapott denaturáló-koncentrációkkal. Ekkor a PCR termékek keverékét meghatározott időközönként injektáltuk a gél egymásra következő zsebeibe, hogy megállapítsuk a csíkok legoptimálisabb szétválásához szükséges futtatási időt („time-travel” technika).

Felhasznált reagensek:

- 40%-os akrilamid oldat (akrilamid : biszakrilamid 37,5 : 1) (Bio-Rad)
- 50x TAE puffer (2M Tris, 1M ecetsav, 0,5M EDTA, pH 8,0) (Bio-Rad)
- Urea (Bio-Rad)
- Formamid (Bio-Rad)
- TEMED (Bio-Rad)
- 10%-os ammónium-perszulfát oldat (APS) (Bio-Rad)
- 6x Gél töltőpuffer (70% glicerín, 0,05% brómfenolkék, 0,05% xilén-cianol) (Fermentas)
- dH<sub>2</sub>O

Négy különböző törzsoldatot készítettünk (4. táblázat), amelyek megfelelő arányú keveréséből 6 és 10%-os PAA tartományban bármilyen denaturáló koncentrációjú gél előállítható. Az oldatokat leszűrtük, légtelenítettük és alufóliába tekert üvegekben 2-8°C-on tároltuk maximum 1 hónapig. A 100%-os koncentrációjú denaturálószer tartalmazó oldatokat használat előtt szobahőmérsékletre melegítettük, hogy a denaturálószer kristályai feloldódjanak.

Felhasznált anyagok	<b>6%-os PAA 0%-os denaturáló koncentráció</b>	<b>6%-os PAA 100%-os denaturáló koncentráció</b>	<b>10%-os PAA 0%-os denaturáló koncentráció</b>	<b>10%-os PAA 100%-os denaturáló koncentráció</b>
40%-os akrilamid oldat	15 ml	15 ml	25 ml	25 ml
50x TAE puffer	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Urea	——	42 g	——	42 g
Formamid	——	40 ml	——	40 ml
dH <sub>2</sub> O	83 ml	100 ml végtérfogatig	73 ml	100 ml végtérfogatig

4. táblázat. A DGGE törzsoldatok összeállításához felhasznált reagensek mennyiségei

Irodalmi adatok alapján (Muyzer és mtsai, 1993) az általunk kapott 450 bázispár hosszú PCR termékekre a 8%-os PAA gél biztosította a legjobb szétválást. Ezért a különböző futtatásokhoz minden esetben 8%-os PAA koncentrációjú gél<sup>t</sup> öntöttünk a merőleges koncentráció-gradiensű gél esetében 20 és 80% denaturáló koncentrációk, a párhuzamos koncentráció-gradiensű gél esetében 20 és 60% denaturáló koncentrációk között. A gradiens gél<sup>t</sup> az első esetben 8% PAA / 20% denaturáló ágens és 8% PAA / 80% denaturáló ágens koncentrációjú, míg a második esetben 8% PAA / 20% denaturáló ágens és 8% PAA / 60% denaturáló ágens alapoldatokból mértük össze. Az alapoldatok összemérését az 5. táblázatban foglaltak szerint végeztük.

Az APS-t csak közvetlenül a gélöntés előtt adtuk az oldatokhoz (a polimerizáció az APS hatására indul meg). A gradiens gél megöntése a két különböző denaturáló koncentrációjú alapoldatból perisztaltikus pumpával működtetett gradiens-képző segítségével történt. A gél megöntését követően a párhuzamos koncentráció-gradiensű gélek tetejére denaturálószer<sup>t</sup> nem tartalmazó töltő gél<sup>t</sup> rétegeztünk, ezáltal elősegítve a DNS bejutását a zsebekből a poliakrilamid gélbe. Merőleges koncentráció-gradiensű gél esetén töltő gél<sup>t</sup> nem alkalmaztunk, hiszen ott zsebek sem voltak, és a gél<sup>t</sup> a gélöntő rendszer merőleges irányú elfordításával készítettük el. A poliakrilamid gél 16x16 cm nagyságú és 1,0 mm vastagságú volt. A zsebekbe, ill. merőleges gél esetén a gél felszínére az előzőleg töltőpufferrel megfelelő arányban összekevert PCR termékeket 50 µl-es Hamilton fecskendővel juttattuk. A minták futtatása BIO-RAD Protean II xi készülékben 60°C-on, 1x-es TAE pufferben történt. Az állandó hőmérsékletet külső termosztáttal összekapcsolt vízkeringtető rendszerrel biztosítottuk, ami a készülék külső és belső puffer tereinek oldatát egyaránt keverte.

Törzsoldatok és a polimerizációhoz szükséges reagens	8%-os PAA gél				
	Merőleges koncentráció gradiensű gélhez		Párhuzamos koncentráció gradiensű gélhez		töltő gél
	20%-os denaturáló koncentráció	80%-os denaturáló koncentráció	20%-os denaturáló koncentráció	60%-os denaturáló koncentráció	0%-os denaturáló koncentráció
6%-os PAA 0%-os denaturáló koncentráció	8,0 ml	2,0 ml	4,8 ml	2,4 ml	4,0 ml
6%-os PAA 100%-os denaturáló koncentráció	2,0 ml	8,0 ml	1,2 ml	3,6 ml	——
10%-os PAA 0%-os denaturáló koncentráció	8,0 ml	2,0 ml	4,8 ml	2,4 ml	4,0 ml
10%-os PAA 100%-os denaturáló koncentráció	2,0 ml	8,0 ml	1,2 ml	3,6 ml	——
TEMED	17 µl	17 µl	10 µl	10 µl	6 µl
APS	84 µl	84 µl	50 µl	50 µl	27 µl

5. táblázat A DGGE gélek alapadataihoz felhasznált törzsoldatok és reagens mennyiségei

Mintafelviteli és futtatási protokollok:

20-80%-os merőleges koncentráció-gradiensű DGGE esetében:

- 405 µl kevert PCR termék + 81 µl töltőpufer
- 10 perc befuttatás 150 V-on
- 11 óra futtatás 100 V-on

20-60%-os párhuzamos koncentráció-gradiensű „time-travel” DGGE esetében:

- 405 µl kevert PCR termék + 81 µl töltőpufer, 35 µl-enként vittük fel a mintákat a zsebekbe, minden mintafelvétel közben egy órát futtattuk a gél
- Összesen 12 óra futtatás, 100 V-on

Az elektroforézist követően a gél 45 percig etidium-bromidban festettük, majd 20 perc desztillált vízben történő festék mentesítés után a kialakuló sávmintázatot UV-fény alatt vizsgáltuk. Az eredményeket digitális képrögzítéssel dokumentáltuk.

#### **6.4.2.4. Az optimalizált DGGE alkalmazása környezeti mintákra**

A fentebb leírt optimalizált módszereket használtuk fel ezután a 2002. októberi minták feldolgozásánál. Az egészséges és pusztuló rizoszféra mintákból a genomiális DNS-t a 6.4.1. alatt részletezett módon kivontuk és abból 6.4.2.1. és 6.4.2.2. szerint állítottuk elő a DGGE futtatáshoz megfelelő PCR termékeket. Minden minta esetében három párhuzamos PCR reakciót végeztünk. Az első termékét közvetlenül felhasználtuk a DGGE futtatáshoz, míg a másodikát és harmadikát összeöntve előbb még megtisztítottuk Viogene PCR-M™ Clean Up System segítségével és a végén a tiszta terméket 35 µl dH<sub>2</sub>O-ban vettük fel, azaz a mintát jelentősen töményítettük.

Az alkalmazott mintafelviteli és futtatási protokoll:

- 30 µl PCR terméket összekevertünk 6 µl töltőpufferrel
- 8%-os PAA gélben 20-60%-os párhuzamos denaturáló koncentráció-gradienst alkalmaztunk
- A mintákat 20 percig 40 V-on futtattuk be a gélbe, majd 12 órán keresztül 100 V-on futtattuk tovább azokat

Az elektroforézist követően a gélt 45 percig etidium-bromidban festettük, majd 20 perc desztillált vízben történő festék mentesítés után a kialakuló sávmintázatot UV-fény alatt vizsgáltuk. Az eredményeket digitális képérzékeléssel dokumentáltuk.

#### **6.4.2.5. DGGE csíkok kivágása, az elválasztott 16S rDNS szakaszok szekvencia analízise**

A gélből a jól elkülönülő csíkokat UV-fény átvilágítás mellett alkohollal leégetett szikével vágtuk ki. A géldarabokat Eppendorf csövekbe tettük, és 20 µl dH<sub>2</sub>O-et rámerve 4°C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Másnap a csöveket lecentrifugáltuk, a felülúszót átpipettáztuk egy új Eppendorf csőbe, és a további feldolgozásig -20°C alatti hőmérsékleten tároltuk.

A felülúszókból ezt követően egy PCR reakcióban újra felszaporítottuk az egyes csíkokhoz tartozó 16S rDNS szakaszokat az SRB385f és DSV838r primerek alkalmazásával. A reakciók összetétele és hőprofilja alapvetően megegyezett a 6.4.2.2. alatt közöltekkel, de itt az SRB385f primer GC kapocs nélküli változatát használtuk (3. táblázat), megnöveltük a templát koncentrációt 5 µl-re és ezzel párhuzamosan csökkentettük a reakciókhoz hozzáadott dH<sub>2</sub>O mennyiségét 24 µl-re. A PCR termék tisztításához a PCR-M Clean Up Systemet

(Viogene) használtuk a gyártó útmutatásainak megfelelően. A tisztított PCR terméket 40 µl dH<sub>2</sub>O-ban vettük fel.

A tisztított PCR termékek szekvenálása és filogenetikai analízise megegyezett a tiszta törzseknél leírtakkal (6.3.4.; a 16S rDNS szekvenálására és filogenetikai analízisére vonatkozó részek), azzal a különbséggel, hogy szekvenáló primerként az 519r helyett a DSV838r primert használtuk.

### 6.4.3. SRB KIMUTATÁSA A KÖZÖSSÉGI DSRAB GÉN KÉSZLET KLÓNOZÁSÁVAL

#### 6.4.3.1. A közösségi *dsrAB* gének felszaporítása PCR reakcióban

A közösségi *dsrAB* gén készlet felszaporítása a DSR1F forward és DSR4R reverz primerek segítségével történt a tiszta törzseknél leírtakkal megegyezően. A PCR reakció összemérése és a reakció hőprofiljának megválasztása az alábbiak szerint történt:

A PCR reakció összetétele:

10x PCR puffer	5 µl	primixnek összemérve
MgCl <sub>2</sub>	3 µl	
dNTP	10 µl	
DSR1F	0,5 µl	
DSR4R	0,5 µl	
dH <sub>2</sub> O	28 µl	
DNS templát	2 µl	
Taq pol. (1 U/µl)	1 µl	
Összesen	50 µl	

A PCR reakció hőprofilja:

Kezdeti denaturáció	98°C	5 perc	
Taq polimeráz bemérése	94°C	10 mp	
Denaturáció	94°C	45 mp	
Anelláció	54°C	45 mp	38x
Extenzió	72°C	90 mp	
Végső extenzió	72°C	20 perc	
Hűtés	4°C	∞	

A PCR terméket a következőkben klónozáshoz használtuk, amelynek kezdeti lépése a PCR termék klónozó vektorba ligálása, annak túlnyúló adenosin (A) nukleotidja révén (TA ligálás). A túlnyúló adenosin nukleotidot a Taq polimeráz illeszti az újonnan szintetizált lánc végére az extenzió során. Hogy a túlnyúló adenosin vég minden PCR terméken megjelenjen, a végső extenzió idejét az eddig alkalmazott 10 percről 20 percre emeltük. Az ily módon nyert PCR termék tisztításához a PCR-M Clean Up Systemet (Viogene) használtuk a gyártó útmutatásainak megfelelően.

#### 6.4.3.2. A közösségi *dsrAB* gének klónozása

A tisztított vegyes PCR termékből klónkönyvtárat a pGEM-T® Easy Vector System I (Promega) segítségével hoztunk létre a gyártó útmutatásait és a következőkben részletezett protokollt követve. A klónozás során felhasznált reagensek a következők voltak:

- pGEM-T® Easy Vector (50 ng/μl) ampicillin rezisztencia génnel és multi-klónozó régióval az IPTG indukált *lacZ'* operonon belül (Promega)
  - T4 DNS ligáz (3 U/μl) (Promega)
  - 2x Rapid Ligation Buffer (Promega)
  - *Escherichia coli* JM109 kompetens sejtek (ampicillin érzékeny, Δ(lac-proAB)/F') (Promega)
  - Ampicillin tartalmú Luria-Bertani (LB) táptalaj (tripton, 10 g; élesztőkivonat, 5 g; NaCl, 10 g; agar, 15 g; ampicillin, 100 mg; desztillált víz, 1000 ml-re kiegészítve)
  - Izopropil-tiogalaktozid (IPTG) oldat (100 mM) (Fermentas)
  - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) oldat (20 mg/ml) (Fermentas)
  - SOC tápleves
  - Steril HPLC tisztaságú dH<sub>2</sub>O
- Először egy 0,2 ml-es PCR csőbe összemértük a következő ligálási reakciót:

2x Rapid Ligation Buffer	5 μl	Tisztított PCR termék	3 μl
pGEM-T® Easy Vector	1 μl	T4 DNS ligáz	1 μl
  - Az így összeállított reakciót óvatos pipetázással összekevertük, majd 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk.
  - Az inkubációt követően rövid centrifugálással összegyűjtöttük a ligálási reakció közeget a cső alján, majd 2 μl-t átmértünk egy steril 1,5 ml-es centrifuga csőbe és jégre helyeztük.
  - A -80°C-on tartott kompetens sejtekből (100-100 μl) egy csövet szintén jégre helyeztünk, hogy felolvadjon (körülbelül 5 perc).
  - Óvatosan átmértünk 50 μl kompetens sejtet a 2 μl ligálási reakcióhoz, óvatos pöccintésekkel elkevertük, majd 20 percre visszahelyeztük a jégre (transzformálás).
  - A transzformálást követően a sejteket 42°C-os vízfürdőben 50 másodperces hősokknak tettük ki, majd rögtön visszatettük jégre további 2 percre.



- Ezután 950 µl szobahőmérsékletű SOC táplevest mértünk a sejtekre és 1,5 órán át 37°C-os rázótermosztátban (150 rpm) inkubáltuk tovább.
- Az inkubációs idő alatt az előző nap készített ampicillines LB táptalajokra 40 µl IPTG és 40 µl X-Gal oldatot szélesztettünk.
- A 1,5 óra letelte után 3 x 100, illetve 2 x 200 µl inkubált SOC táplevest szélesztettünk 6 darab fentiek szerint előkészített LB táptalajra.
- A táptalajokat 16-24 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk, majd a kék-fehér szelekció kifejlődését követően, a fehér telepeket steril fogpiszkálók segítségével 1 cm-es rácsban átpontoztuk a fentivel megegyező összetételű LB táptalaj lemezek felületére.
- Újabb 16-24 órás, 37°C-os inkubációt követően a kinőtt telepeket 20 µl dH<sub>2</sub>O-ban vettük fel, a kapott sejtszuszpenziót alaposan vortexeltük, majd 95°C-on 5 percig denaturáltuk.
- A denaturáció révén feltárt sejteket lecentrifugálva (14000 g, 5 perc), a kapott felülúszókból 15 µl-eket újabb centrifuga csövekbe vittünk át.

#### **6.4.3.3. A klónozással szeparált *dsrAB* inzertek felszaporítása PCR reakcióban**

Az egyes klónok vektoraiban hordozott különböző inzert szekvenciákat (a közösségi *dsrAB* PCR pool egyes szekvenciáit) újabb PCR reakciókban szaporítottuk fel. A PCR reakciók összetétele és hőprofilja megegyezett a 6.4.3.1. alatt közöltekkel. A DNS templátot ebben az esetben 2 µl az előzőekben kapott felülúszó jelentette. Az ily módon nyert PCR termékek tisztításához a PCR-M Clean Up System-et (Viogene) használtuk a gyártó útmutatásainak megfelelően.

#### **6.4.3.4. A PCR termékek RFLP analízise**

A PCR termékek RFLP analízise és az RFLP csoportok kialakítása mindenben megegyezett a tiszta törzseknél leírtakkal (6.3.3.).

#### **6.4.3.5. A klónok szekvenálása és filogenetikai analízise**

A csoportrepresentáns klónok szekvenálása és filogenetikai analízise mindenben megegyezett a tiszta törzseknél leírtakkal (6.3.4.; *dsrAB* gén szekvenálására és filogenetikai analízisére vonatkozó részek).

## 7. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEŚÜK

### 7.1. A TENYÉSZTÉSBE VONT *CLOSTRIDIUMOK* ÉS SZULFÁTREDUKÁLÓ BAKTÉRIUMOK CSÍRASZÁMÁNAK ALAKULÁSA A VELENCEI-TÓ ÜLEDÉKÉBEN ÉS A NÁD RIZOSZFÉRÁBAN

A leggyakrabban és általunk is alkalmazott 5 tesztcsöves MPN módszer előnye, hogy viszonylag gyorsan és egyszerűen nyerhetünk információt a vizsgálni kívánt célszervezetek gyakoriságáról és eloszlásáról. A hátránya, mint általában minden tenyésztésen alapuló eljárás az, hogy az alkalmazott tápközeg összetétele meghatározza a rajta növekedésre képes mikroorganizmusokat, ami a természetes környezetben fellelhető gyakorisághoz képest alulreprezentáltságot eredményez. Éppen ezért a következőkben tárgyalt csíraszám értékek valójában csak az adott tápközegben tenyésztésbe vonható szervezetek becsült számáról (legvalószínűbb csíraszámáról) nyújtanak információt.

A Lángi-tisztás és a Fürdető nádasállományának rizoszférájából a tenyésztésbe vont *Clostridiumok* legvalószínűbb csíraszámának (pontosabban a választott metodika alapján spóraszámának) becslését a 2000. júniusi mintából végeztük el. Az alkalmazott RMAC differenciáló tápközegben kapott csíraszámokat a 6. táblázatban tüntettük fel. Összehasonlításként a környező vegetációtól mentes üledékre is elvégeztük a csíraszámbecslést.

<i>Clostridium</i> endospórák RMAC tápközegben számolva	Rizoszféra		Környező üledék	
	MPN/g	95%-os konfidencia intervallum	MPN/g	95%-os konfidencia intervallum
Lángi-tisztás, egészséges nádasállomány és környező üledék	$3,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5 - 9,4 \times 10^5$	$5,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4 - 1,5 \times 10^5$
Fürdető, pusztuló nádasállomány és környező üledék	$3,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5 - 8,0 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	$7,1 \times 10^3 - 6,0 \times 10^4$

6. táblázat. A tenyésztésbe vont *Clostridium* endospórák legvalószínűbb csíraszám értékei (MPN/g) a velencei-tavi nádasállományok rizoszférájából és a környező üledékből a 2000. júniusi mintavétel alapján

A SRB csíraszámbecslését a 2002. júniusi és októberi egészséges és pusztuló rizoszféra, valamint üledék mintákon vegyes savas és tejsavas, a 2004. júniusi egészséges rizoszféra és üledék mintákon már csak tejsavas PMB táplevesekkel végeztük el. A szulfátredukáló baktériumok által képezett endospórák számának becslését csak a 2004. júniusi mintából végeztük. Az alkalmazott tápközegeken tenyésztésbe vont SRB

legvalószínűbb összes csíraszámra és endospóraszámra vonatkozó eredményeit a 7. táblázat tartalmazza.

Mintavételi időpont, tápközeg, mintavételi hely, összes sejt- vagy endospóraszám			Rizoszféra		Környező üledék	
			MPN/g	95%-os konfidencia intervallum	MPN/g	95%-os konfidencia intervallum
2002. 06.	Tejsavas PMB	Lángi-tisztás, egészséges nádasállomány, összes sejt	$6,1 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6 - 1,2 \times 10^7$	$5,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5 - 1,4 \times 10^6$
		Fürdető, pusztuló nádasállomány, összes sejt	$5,1 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$	$4,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5 - 1,1 \times 10^6$
	Vegyes savas PMB	Lángi-tisztás, egészséges nádasállomány, összes sejt	$3,9 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6 - 8,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5 - 1,1 \times 10^6$
		Fürdető, pusztuló nádasállomány, összes sejt	$3,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6 - 8,5 \times 10^6$	$6,6 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5 - 1,5 \times 10^6$
2002. 10.	Tejsavas PMB	Lángi-tisztás, egészséges nádasállomány, összes sejt	$2,7 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6 - 6,5 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$	$7,5 \times 10^4 - 6,7 \times 10^5$
		Fürdető, pusztuló nádasállomány, összes sejt	$1,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5 - 3,0 \times 10^6$	$3,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5 - 9,4 \times 10^5$
	Vegyes savas PMB	Lángi-tisztás, egészséges nádasállomány, összes sejt	$3,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6 - 7,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^5$	$8,2 \times 10^4 - 7,9 \times 10^5$
		Fürdető, pusztuló nádasállomány, összes sejt	$2,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6 - 4,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$	$7,5 \times 10^4 - 6,7 \times 10^5$
2004. 06.	Tejsavas PMB	Lángi-tisztás, egészséges nádasállomány, összes sejt	$1,3 \times 10^7$	$7,8 \times 10^6 - 2,3 \times 10^7$	$5,4 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5 - 1,4 \times 10^6$
		Lángi-tisztás, egészséges nádasállomány, endospórák	$9,3 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3 - 2,2 \times 10^4$	$4,1 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3 - 8,8 \times 10^3$

7. táblázat. A tenyésztésbe vont szulfátredukáló baktériumok legvalószínűbb csíraszám értékei (MPN/g) a velencei-tavi nádasállományok rizoszférájából és a környező üledékből

Az MPN csíraszámbecslés eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy az egyes mintavételi időpontokban az egészséges és pusztuló nádasállományokból származó (és a SRB esetében különböző táplevesekben is dúsított) mintáknál a *Clostridium* endospórák, illetve az összes SRB számában szignifikáns különbség nem mutatkozott ( $P > 0,05$  minden esetben). Hasonlóan az egyes mintavételi időpontokban különböző helyekről származó üledékminták esetében sem mutatkozott szignifikáns különbség.

A csíraszámbecslés alapján tehát nem találtunk különbséget az egészséges és pusztuló nádasállományok *Clostridium* és szulfátredukáló baktérium közösségeinek mennyiségeiben. Mindazonáltal óvatosan kell kezelnünk ezt az eredményt, mivel az MPN módszer csak az adott tápközegekben növekedni képes baktériumok csíraszámának becslésére alkalmas. A SRB esetében ugyanazon minta eltérő szénforrás készletű táplevesekkel (tejsavas, illetve a tejsav mellett egyéb szerves savakat is tartalmazó) végzett csíraszámbecslései sem eredményeztek különbséget. Ez alapján viszont feltételezhetjük, hogy az alkalmazott táplevesekben minden esetben a tejsavat hasznosító SRB dúsultak a legnagyobb és így meghatározó mértékben. A

2004. júniusi mintánál ezért már csak tejsav tartalmú PMB táplevest alkalmaztunk a SRB csíraszámának becsléséhez.

Mindazonáltal a különböző minták esetében mind a *Clostridium* endospórák száma, mind az összes SRB sejtszám legalább egy nagyságrenddel nagyobbak adódtak a nád rizoszférajában, mint a környező vegetációtól mentes üledékben ( $P < 0,05$  minden esetben). A legkisebb különbséget a Fürdető környéki pusztuló nádasállományból 2002. október elején vett minta tejsavas PMB levesben becslött összes SRB sejtszámában találtuk ( $1,6 \times 10^6$  MPN/g a rizoszférajában és  $3,4 \times 10^5$  MPN/g az üledékben, kismértékben átfedő konfidencia intervallumokkal). A t-próba alapján azonban ez is szignifikáns különbségnek bizonyult 95%-os megbízhatósági szinten ( $P = 0,009 < 0,05$ ).

A *Clostridium*ok és a szulfátredukáló baktériumok megemelkedett csíraszama a rizoszférajában valószínűsíthetően jórészt az adott környezet nagyobb mennyiségű és változatosabb összetételű szénforrás és elektron donor tartalmának köszönhető, ami egyrészt a gyökér által kiválasztott anyagokból (az úgynevezett gyökér exudátumokból), másrészt a degradálódó növényi részekből származhatott (Wind és Conrad, 1997; Lu és mtsai, 2006). A SRB előfordulására és gyakoriságára mindazonáltal a *Clostridium*ok nagyobb száma is hatással lehet azáltal, hogy aktivitásuk révén a megemelkedett mennyiségű fermentációs végtermékek (legnagyobbbrészt egyszerű szerves savak és alkoholok) a szulfátredukáló szervezetek számára többségében jól hasznosítható szubsztrátumok lehetnek. Ilyen módon a szulfátredukáló baktériumok mennyiségi dinamikája összefüggést mutathat az adott közösség *Clostridium* fajainak tömegességével, ahogy azt Mallet és mtsai (2004) is kimutatták egy franciaországi eutróf tó (Aydat) üledékében kemotaxonómiai módszer (membrán zsírsav analízis) alkalmazásával.

A mocsári növények és köztük a nád rizoszférajának további sajátossága, hogy a növény aerenchima rendszerén keresztül oxigént juttat a gyökérzetébe és azon keresztül a rizoszférajába. Az oxigén szállítása a gyökérzetbe elsősorban a gyökér légzését szolgálja, de a főként fiatal gyökök csúcsi részén a rizoszférajába kijutó oxigén megváltoztatja a redox viszonyokat, és lehetővé teszi az aerob biológiai és abiotikus oxidációs folyamatokat. A folyamatok hatása az itt élő anaerob mikroorganizmusokra kettős. A szulfátredukáló baktériumokat alapul véve a kijutó oxigén egyfelől lehetővé teszi a redukált kénvegyületek kémiai, illetve legnagyobbbrészt biológiai újraoxidálását és lokális kénkörforgalmi rendszerek kialakulását, ami által a rizoszférajában a környező üledékénél nagyobb szulfát koncentráció alakulhat ki, ami tovább növelheti a SRB számát és aktivitását az üledékhez képest. Az oxigén kijutása a gyökerekből mindazonáltal nem egyértelműen előnyös a SRB és más

anaerob baktériumok számára. Különösen igaz ez a nád és más vízből kiemelkedő növények esetében, ahol az oxigén „szívárgása” a gyökerekből a rizoszféra állandó folyamat és nemcsak a fotoszintetikusán aktív napszakokhoz kötődik, mint a teljesen alámerülő életformát folytató vízi növények esetében. A rizoszféra környezetekben tehát azok az anaerob mikroorganizmusok rendelkeznek szelektív előnnyel, amelyek az oxigén toxikus hatását bizonyos szintig tolerálni képesek. A szulfátredukálók közül ez különösen a *Desulfovibrio* és a *Desulfobulbus* nemzetség tagjaira igaz (Cypionka és mtsai, 1985; Cypionka, 2000; Jonkers és mtsai, 2005). Ismeretes, hogy ezek a fajok jelentős szerepet játszanak természetes biofilmekben is mind különböző szennyvíztisztító rendszerekben, mind vízi növények gyökérfelületein (Santegoeds és mtsai, 1998; Küsel és mtsai, 1999). A kialakuló biofilmek nagyszámú és változatos mikroba populációt képesek koncentrálni, amelyen belül szintén kialakulhatnak lokális anyagforgalmi rendszerek, többek között akár teljes kénkörforgalom is (Santegoeds és mtsai, 1998; Okabe és mtsai, 2005). Santegoeds és mtsai (1998) azt is megállapították, hogy a biofilmekbe diffúzióval bejutó oxigén nagy része (akár 70%-a is) a szulfid ionok újraoxidálására fordítható, ami a szulfátredukálók aktivitása szempontjából meghatározó jelentőségű, és egyben a elősegíti a rizoszféra belüli anaerob mikrokörnyezetek kialakulását is. A rizoszféra belépő oxigén felhasználásában a szulfidoxidáló baktériumokon kívül természetesen nagy számban részt vesznek aerob, illetve fakultatív anaerob heterotróf baktériumok is. Mennyiségük és aktivitásuk szoros kapcsolatban van a környezet szervesanyag tartalmával. Esetünkben a mintavételi helyek a Velencei-tavon valóban nagy szervesanyag terheléssel jellemezhetők (Reskóné és Borsodi, 2003), ami az adott környezetekben az oxigénszint nagyobb mértékű csökkenéséhez vezethet, ezáltal is elősegítve az anaerob mikroorganizmusok, így az általunk vizsgált *Clostridium* és szulfátredukáló baktériumok elszaporodását.

A szulfátredukáló baktériumok esetében az általunk választott differenciáló tápközegben növekedni képes teljes sejtszám meghatározása mellett 2004. júniusában elvégeztük az endospórák számának meghatározását is. Az SRB endospórák száma az összes SRB sejtszámmal összehasonlításban jóval alacsonyabb volt a rizoszféra ( $P = 5,4 \times 10^{-5}$ ) és az üledékben ( $P = 6,0 \times 10^{-4}$ ) egyaránt. Mindemellett az SRB endospórák számában a rizoszféra és az üledék között szignifikáns különbség nem mutatkozott ( $P = 0,241$ ). A rizoszféra az SRB endospórák aránya a teljes sejtszámmal viszonyítva körülbelül 0,1%-nak adódott. Mivel a későbbiekben spóráképző SRB (elsősorban *Desulfotomaculum*) fajokat a hőkezelés nélküli MPN sorozatok legnagyobb hígítású, még pozitív tagjaiból nem sikerült kitenyészteni, valamint kimutatásuk tenyésztéstől független molekuláris módszerrel sem

vezetett eredményre, feltételezhetjük, hogy számarányuk és aktivitásuk a nád rizoszférájában a többi fajhoz képest jóval kisebb lehetett. Ez éppen ellentétes a rizs gyökérkörnyezetéből megfigyelt eredményekkel, ahol is a *Desulfotomaculum* fajokat, mint a rizsföldek és a rizs rizoszférájának domináns képviselőit írták le (Widdel, 1992; Wind és mtsai, 1999; Stubner és Meuser, 2000). Mindez nem meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy a rizsföldeket kolonizáló szulfátredukáló baktériumoknak szembe kell nézniük az időszakos elárasztás és kiszáradás váltakozó hatásával, ami mindenképpen az endospórás *Desulfotomaculum* fajok tömegesebb megjelenése irányába ható szelekciós tényező. Ezek a baktériumok ugyanis endospóráik révén képesek túlélni az adott környezet kiszáradását és az anoxikus viszonyok időleges megszűnését. Másrészt viszont a *Desulfotomaculum* fajoknál az irodalom nem számol be olyan mértékű oxigén toleranciáról, mint a már fent említett Gram-negatív nemzetségek (*Desulfobrio*, *Desulfobulbus*) esetében. Ez azért is említésre méltó, mivel irodalmi adatok alapján, a nádnövény gyökerein keresztül végbemenő gáztranszport (és így az oxigén kibocsátás mértéke is) sokkal jelentősebb, mint a rizsnövény esetében (Armstrong és mtsai, 1996; Denier van der Gon és van Breemen, 1993), ami által a nád rizoszférájában inkább az oxigén tolerancia vehető számításba.

## **7.2. TENYÉSZTÉSBE VONT *CLOSTRIDIUM* FAJOK A VELENCEI-TAVI NÁDASOK RIZOSZFÉRÁJÁBAN**

A *Clostridium* fajok tenyésztése során három különböző táptalajról összesen 128 törzset izoláltunk, és ezek közül 100-at sikerült tiszta tenyészetben fenntartanunk. Közülük 43 származik az egészséges és 57 a pusztuló nádasállomány rizoszféra mintájából. Az izolátumok megoszlását a mintavételi helyek, és az alkalmazott tápközegek szerint a 8. táblázat mutatja.

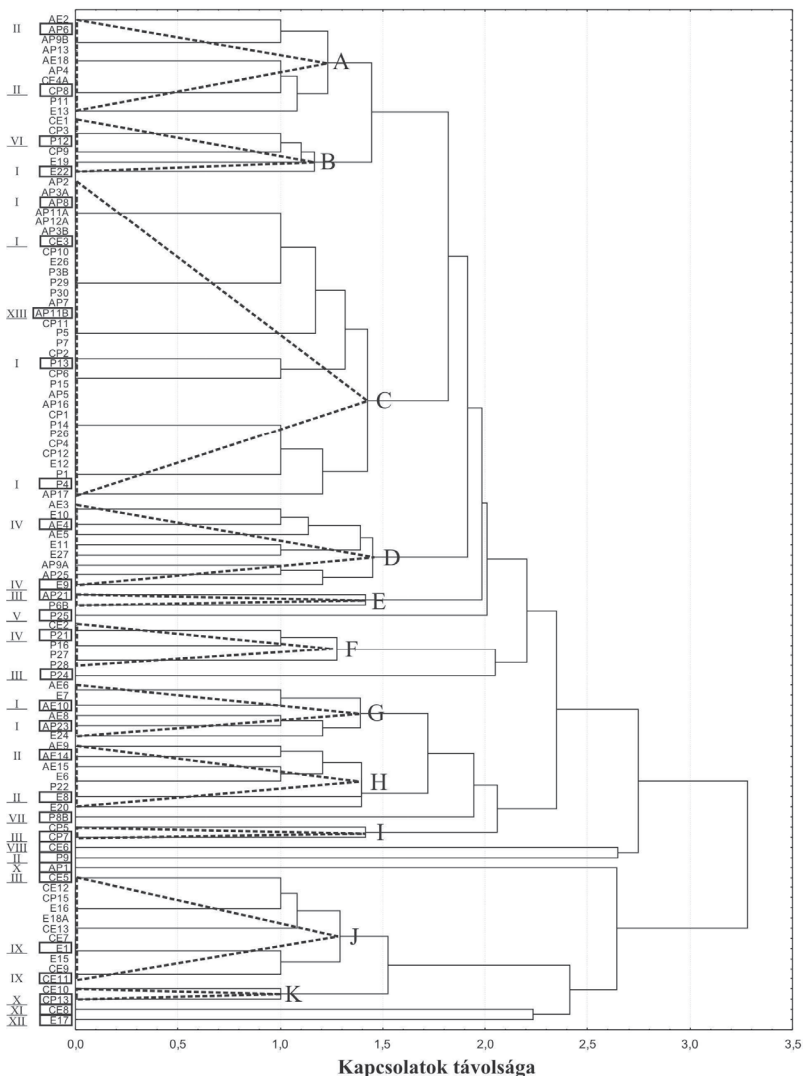
A fenotípusos vizsgálatok során mindegyik törzs Gram-pozitív festődést mutatott, és kataláz negatív reakciót adott. Két törzs (CE6 és P8B) kivételével mindegyik képezett endospórát. A sejtmorfológiai adatok és az API20A teszt eredményeinek felhasználásával készített dendrogramon összesen 19 fenont különítettünk el (4. ábra). Az azonos fenonokba sorolt törzseknél az euklideszi távolságmátrix alapján a kapcsolatok távolsága <1,5 volt. Az egyes törzsek részletes sejtmorfológiai adatait és API20A teszteredményeit a dendrogram szerinti sorrendben a függelék tartalmazza.

Minta származása	Alkalmazott dúsító és izoláló tápközeg			Mintavételi helyek szerint összesen
	RCM	RMAC	CM3	
Egészséges nádas	19	11	13	43
Pusztuló nádas	23	20	14	57
Tápközegeken összesen	31	27	42	

8. táblázat. A velencei-tavi nádasállományok rizoszférájából kitenyészített törzsek megoszlása a mintavételi helyek és az alkalmazott tápközegek szerint

A dendrogram 11, nagybetűvel (A-K) jelölt, fenotípusosan jelentős egyezést mutató törzscsoportja 2 és 32 közötti számban tartalmaz baktériumtörzseket, míg a többi 8 fenon csak egy-egy törzset reprezentál. A dendrogram legkülső elágazása az összes fenont két élesen elkülönülő ágra osztja. A felső ágon találhatjuk meg izolált törzseink 84%-át 9 (A-I) törzscsoportban és 5 csoportokon kívül eső törzssel, míg törzseink fennmaradó 16%-a 2 (J és K) törzscsoportban és 3 csoportokon kívül eső törzssel az alsó ágon helyezkedik el (x. ábra). Az ágak közötti szétválást a törzsek, illetve a törzscsoportok között a hasznosított cukrok számában és típusában tapasztalt eltérések eredményezték. Az alsó ágon elhelyezkedő törzsek mindegyike jóval szélesebb körben hasznosított cukrokat, és közülük hat (mannitol, laktóz, szacharóz, xilóz, arabinóz és cellobióz) esetében szinte kizárólagosan itt figyeltünk meg értékesítést. A felső ág esetében az egyes csoportokba tartozó törzsek jóval kisebb számú cukrot hasznosítottak, és ez a képesség is jellegzetesen különbözött a fenonok között (függelék).

A felső ágon találjuk a legnagyobb taglétszámú fenont (C jelzésű, 32 törzs). Az ide tartozó törzsek többségére a zselatin és az eszkuin hidrolízise volt jellemző, kisebb részük emellett még glükózt is hasznosított, de más szénhidrátot nem. Az összes többi fenon törzseinél már általános volt a glükóz bontása. Az A és a B fenonokba sorolt 10, illetve 9 törzs ezen túlmenően mannózt is hasznosított, szétválásuk az indol képzéshez kapcsolódott. A D fenonba tartozó mind a 9 törzs bontotta a trehalózt, és több mint a fele a maltózt is.



4. ábra. A velencei-tavi nádasállományok rizoszférájából kitenyésztett törzsek fenotípusos tulajdonságai alapján UPGMA módszerrel, euklideszi távolságmátrix alapján készített dendrogram (A betűk A-tól K-ig a kialakított törzscsoportokat (fénonokat), a bekeretezett törzsek a 16S RFLP analízisre kiválasztott törzseket, míg a római számok az RFLP csoportokat jelölik, az aláhúzás megszekvenált törzsre utal.)



A felső ág kisebb (E-I) fenonjaiban már általános volt a maltóz hasznosítása is, amihez az egyes csoportokra jellemzően társult a szalicin, a glicerol, a mannóz, a szorbitol és a trehalóz bontásának képessége. Az önálló fenonokat képező törzseknél (P25, P24 és P8B) az előbb felsorolt szénforrások hasznosítása részben egyedi kombinációkban jelentkezett, részben a fenti ágon egyedülként képesek voltak a xilóz, illetve az arabinóz bontására.

A dendrogram alsó ágán lévő, az előzőktől határozottan elkülönülő J és K jelzésű fenonok törzseinél már nagyon széles volt a hasznosított szénforrások skálája, a melozitóz, a raffinóz és a ramnóz kivételével az összes szénhidrátot bontották. Fontos jellegzetessége e fenonok törzseinek, hogy valamennyien bontották a cellobiózt is, ami a cellulóz hasznosításának képességére is utalhat. Ez összhangban van azzal a ténnyel is, hogy e törzsek döntő többségét cellulózos dúsító táptalajról tenyésztettük ki (CE és CP jelzésű törzsek).

Az egészséges és a pusztuló nádasok rizoszféra mintáiból származó törzsek a kettőnél nagyobb taglétszámú fenonok esetében vegyes eloszlást mutatnak. Bár az E és az I fenonok 2-2 törzse kizárólag a pusztuló rizoszféra mintából került elő, a fenonok kis mérete miatt ebből nem szabad statisztikai következtetést levonnunk. Érdemes viszont megfigyelni az egyes vegyes eloszlású csoportok esetében a különböző mintavételi helyekről származó törzsek arányát. Ez különösen szembetűnő a legnagyobb taglétszámú C fenonnál, ahol a 32 törzsből 29 a pusztuló nádas rizoszférájából származott, és az alsó ágon található második legnagyobb fenon (J) esetében, ahol a 11 törzsből 9-et az egészséges nádasállomány rizoszférájából izoláltunk. A kisebb csoportoknál azok mérete miatt nagyobb óvatossággal kell kezelnünk az eredményeket, de említésre méltó hasonló aránybeli eltérés mutatkozik a D (10 törzsből 7 az egészséges mintából), az F (5 törzsből 4 a pusztuló mintából), a G (6 törzsből 5 az egészséges mintából) és a H (7 törzsből 6 az egészséges mintából) fenonok esetében is. Összevetve mindezt a szénforrás hasznosítási vizsgálat eredményeivel (függelék) azt is megállapíthatjuk, hogy a főként az egészséges nádas rizoszférájából származó törzseket tartalmazó csoportok nagyobb mértékű szénforrás (és ezen belül főleg cukor) hasznosító képességgel rendelkeztek, mint az elsősorban pusztuló rizoszféra mintából származó törzsek csoportjai.

A fenonokból az 4. ábrán bekeretezéssel jelölt törzseket a továbbiakban DNS alapú molekuláris biológiai vizsgálatoknak vetettük alá. A törzsek kiválasztásánál arra törekedtünk, hogy a fenotípusos csoportokon belül minden jelentősebb eltérést mutató törzs képviseltesse magát. Ezért például a legnagyobb csoportból 5 törzs került kiválasztásra, az indol képzésben, a glükóz hasznosításában és a zselatin hidrolízisében tapasztalt eltérések, valamint a teljes inaktivitás miatt. A 30 reprezentáns törzs PCR reakcióban felszaporított 16S

rDNS szakaszain végzett RFLP analízis (ARDRA) eredményeképpen 13 eltérő hasítási mintázattal rendelkező csoportot különítettünk el. Mindezt kiegészítve a fenotípusos csoportosítás eredményeivel összesen 20 reprezentatív törzset választottunk ki a 16S rDNS génszakaszuk részleges szekvenálására. A szekvencia analízisek eredményét a 9. táblázat tartalmazza.

16S-RFLP csoport (törzsek száma)	Fenotípusos csoport (törzsek száma)	Reprezentáns törzs	A GenBank adatbázisban a legközelebbi rokon típus törzs, azonosító szám, %-os hasonlóság
I (7)	C (32)	CE3	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 3584T X68189, 99,1%
	G (6)	AE10	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 3584T X68189, 99,8%
II (5)	A (10)	CP8	<i>Clostridium bifermentans</i> NCIMB 10716T X73437, 98,3%
	H (7)	E8	<i>Clostridium bifermentans</i> NCIMB 10716T X73437, 99,1%
	csoporton kívül	P9	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824T U16166, 93,8%
III (4)	E (2)	AP21	<i>Tissierella praeacuta</i> ATCC 25539T X80833, 99,1%
	I (2)	CP7	<i>Clostridium uliginosum</i> CK55T AJ276992, 97,0%
	J (11)	CE5	<i>Tissierella praeacuta</i> ATCC 25539T X80833, 97,3%
	csoporton kívül	P24	<i>Clostridium uliginosum</i> CK55T AJ276992, 97,0%
IV (3)	D (9)	E9	<i>Clostridium glycolicum</i> DSM 1288T X76750, 98,9%
	F (5)	P21	<i>Clostridium glycolicum</i> DSM 1288T X76750, 98,8%
V (1)	csoporton kívül	P25	<i>Bacillus pycnus</i> NRRL NRS-1691T AF169531, 95,6%
VI (1)	B (6)	P12	<i>Clostridium argentinense</i> ATCC 27322T M59087, 94,4%
VII (1)	csoporton kívül	P8B	<i>Clostridium celerecrescens</i> DSM 5628T X71848, 98,6%
VIII (1)	csoporton kívül	CE6	<i>Clostridium carboxidivorans</i> DSM 15243T AY170379, 98,5%
IX (2)	J (11)	E1	<i>Clostridium diolis</i> DSM 5431T AJ458418, 99,8%
X (2)	K (2)	CP13	<i>Bacillus pycnus</i> NRRL NRS-1691T AF169531, 94,9%
XI (1)	csoporton kívül	CE8	<i>Bacillus pycnus</i> NRRL NRS-1691T AF169531, 94,9%
XII (1)	csoporton kívül	E17	<i>Bacillus thuringiensis</i> CIP 53.137T D16281, 100,0%
XIII (1)	C (32)	AP11B	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 3584T X68189, 98,6%

9. táblázat. A velencei-tavi nádasállományok rizoszférájából kitenyésztt, majd a fenotípusos és genotípusos csoportosítás eredményeként kiválasztott törzsek 16S rDNS alapú identifikálásának eredményei

A 9. táblázatban és a 4. ábrán bemutatott eredményekből látható, hogy a 16S rDNS RFLP analízise bizonyos esetekben az egymástól különváló fenonok összevonásához (B – C – G, A – H – P9, E – I – J – P24, valamint D – F), más esetekben viszont az ugyanabból a fenonból kiválasztott törzsek különböző 16S-RFLP csoportokba (mint a B, C és J csoportok esetében) kerüléséhez vezetett. A szekvencia analízisek eredménye ugyanakkor többségében a fenotípusos csoportosítást támasztotta alá, azaz az egyazon 16S rDNS RFLP csoportból, de eltérő fenonokból származó törzsek különböző fajokhoz tartoznak. Ezt lehet megfigyelni a II-es 16S-RFLP csoport esetében, ahol a fenotípusos csoportokon kívül eső P9 jelzésű törzs a *Clostridium acetobutylicum* fajhoz tartozik a *Clostridium bifermentans*sal szemben, valamint a III-as 16S-RFLP csoportnál, ahol az egyes elkülönülő fenonokat reprezentáló törzsek a *Clostridium uliginosum*, illetve a *Tissierella praeacuta* fajokhoz tartoznak. Máshol az ugyanazon 16S-RFLP csoportba, de különböző fenonokba tartozó törzsek a szekvencia analízisek alapján is ugyanazzal a fajjal mutatnak legnagyobb szekvencia egyezést, amint a C és a G, valamint az A és a H fenonok esetében látható. Ez látszólag csupán az RFLP analízis pontosságát igazolja, ám az egy fajon belül megjelenő törzsek közötti fenotípusos (itt főleg szénforrás hasznosítást jelentő) különbségek fontos részleteket tárnak fel a közösség egészének működése szempontjából. A harmadik esetben az eredmények egyértelműen az RFLP analízist támasztották alá, amikor is az egy fenonból származó különböző 16S-RFLP csoportok különböző fajok képviselőinek bizonyultak. Ez utóbbi esetben annak eldöntése, hogy a csoportot alkotó többi nem reprezentáns törzs melyik fajhoz tartozik, a fontosnak ítélt fenotípusos jellemzők egyezésén, illetve különbözőségén alapulhat, a reprezentánsok kiválasztásának megfelelően. És végül találunk példát a negyedik esetre is, ahol az egy fenonból származó különböző 16S-RFLP csoportok ugyanahhoz a fajhoz tartoztak, amint az a C fenon I-es és XIII-as 16S-RFLP csoportjai (CE3 és AP11B reprezentáns törzsekkel) esetében is látszik. Mindezen esetek azt mutatják, hogy a fenotípusos és a DNS alapú megközelítések együttes alkalmazása egy pontosabb és részletgazdagabb képet rajzol ki számunkra a velencei-tavi nádasok rizoszférájának *Clostridium* közösségeiről.

A szekvencia analízisek során törzseink 16S rDNS szekvenciáit csak nemzetközi törzsgyűjtemények típus-törzseinek szekvenciáival összehasonlításban vizsgáltuk, mivel a *Clostridium* nemzetségben belül gyakori, hogy különböző fajok 16S rDNS szekvenciái akár 98,0%-nál is nagyobb mértékben hasonlítanak egymásra, és ilyenkor a típus-törzsek szekvenciája számít referenciának (Wiegel és mtsai, 2006). A szekvencia analízisek eredményeit áttekintve láthatjuk, hogy a kitenyésztett törzsek között nem *Clostridium* nemzetségbe tartozók is szerepelnek, amelyek endospórás baktériumokként szintén túlélték a

dúsításokat megelőző szelektív hőkezelést, és képesek voltak szaporodni a *Clostridium*ok számára kifejlesztett táptalajokon. Az idetartozó 4, a *Bacillus* fajokkal rokon törzset (a K fenon 2 törzsét és a 2 csoportokon kívüli törzset) a továbbiakban nem részletezzük. Kivételt teszünk azonban a *Tissierella praeacuta* rokonsági körébe tartozó törzsek esetében, mivel ezek a törzsek ugyanilyen mértékű hasonlóságot mutatnak a *Clostridium hastiforme* típus törzsével is. Az utóbbi időkben a 16S rDNS szekvencia analízisek és a teljes genomi DNS-DNS hibridizáció révén igazolást nyert, hogy a két fajleírás mögött ugyanaz a faj áll (Bae és mtsai, 2004), és mivel a *Tissierella praeacuta* a korábbi, a faj elnevezésében ez élvez elsőbbséget.

A fentiek alapján a reprezentatív törzsek 16S rDNS szekvencia szakaszainak és a közeli rokon referencia szekvenciáknak (GenBank) a bevonásával filogenetikai dendrogramot szerkesztettünk (5. ábra). Itt kell megemlítenünk, hogy az irodalmi áttekintés 4.2.2. A *Clostridium*ok filogenetikai leszármazása c. fejezetében már részletezett okok miatt, csak a filogenetikai fa CI jelzésű ágán elhelyezkedő törzseink tartoznak a szigorúan vett *Clostridium* nemzetséghez, a többi ágon (CII – CIV) elhelyezkedő törzsek és fajok a 16S rDNS szekvencia analízisek alapján kívül esnek azon. A hagyományos fenotípusos tulajdonságokon alapuló osztályozás azonban ebbe a nemzetségbe sorolta azokat is. Wiegel és mtsai (2006) a CII és CIV ágon elhelyezkedő érvényesen leírt *Clostridium* fajokat a Peptostreptococcaceae, míg a CIII ágon találhatóakat a Lachnospiraceae családokba javasolják áthelyezni.

Amint az a filogenetikai dendrogramon is látható, a szekvencia illesztések alapján az AP11B, AE10 és a CE3 jelzésű törzsek a *Clostridium sporogenes* fajhoz tartoznak megbízhatóan magas 16S rDNS hasonlósági szinten. Az általuk reprezentált 16S-RFLP csoportokba (I és XIII), valamint fenotípusos csoportokba (C és G) tartozik összes törzsünk közel 40%-a. Gregory és mtsai (1978) a *Clostridium sporogenes* fajnál kimutatták a szuperoxid-dizmutáz enzim jelenlétét, ami a szuperoxid anionból hidrogén-peroxidot képez, és így elsősorban az aerob szervezetekben fontos szerepet tölt be a reaktív oxigén-gyökök elleni védekezésben. Feltehetően ennél a fajnál is szerepet játszhat az O<sub>2</sub>-szenzitivitás mérséklésében, ami jelentősen segítheti elterjedését a részlegesen aerob rizoszférában. A *Clostridium sporogenes* fajra jellemző még, hogy jól tűri a közeg lúgos kémhatását. Karlsson és mtsai (1988) 11,7 pH érték mellett is tapasztaltak nála növekedést. Mivel a Velencei-tó vizének és üledékének a pH-ja enyhén lúgos, ez a tulajdonság is hozzásegítheti ahhoz, hogy a nádrizoszféra domináns *Clostridium* faj legyen.



85

Szénforrás hasznosítási képességét illetően, a *Clostridium sporogenes* alapvetően proteolitikus faj (Elsden és mtsai, 1980), amelynél számos fehérje (Ionata és mtsai, 2008) és aminosav (Elsden és Hilton, 1979) hasznosítását kimutatták. Fenotípusos (alapvetően biokémiai tulajdonságokon alapuló) és genotípusos (16S-RFLP analízisre alapozott) vizsgálataink eredményeit összevetve, a *Clostridium sporogenes* fajoként azonosított törzsek két jól elkülönülő csoportot alkottak a fenotípusos dendrogramon (4. ábra, C és G fenonok). A C fenonba tartozó törzsek csak nagyon kis mértékben hasznosították a felkínált szénforrásokat, a cukrok közül jellemzően csak a glükózt bontotta a törzsek nem egészen egynegyede. Legnagyobb részük csak a zselatint és az eszkulint hidrolizálta. A G csoportba tartozó törzseinknél ezzel szemben a zselatin és eszkulin hidrolízis mellett általános volt a glükóz, a maltóz és a szalicin hasznosítása, és néhányuknál glicerol, mannóz és trehalóz értékesítést is meg lehetett figyelni. A két csoport azonban nem csak az említett biokémiai jellemzők mentén vált el egymástól, hanem a mintavételi helyek tekintetében is. Ahogy azt már korábban említettük a C fenont alkotó 32 törzs körülbelül 90%-át a pusztuló nádasállomány rizoszférájából izoláltuk, míg a G fenon 6 törzse közül mindössze 1 származott onnan. Ez egyfelől arra utalhat, hogy az egészséges nádas rizoszférájából izolált *Clostridium sporogenes* törzsek jellemzően a gyökér által kínált, cukrokban gazdag szénforrás készletre állítják át anyagcsere aktivitásukat. Ehhez hasonló tendenciát tapasztalhatunk a legtöbb, az egészséges rizoszférából származó izolátum dominanciáját mutató törzscsoportnál is. Másfelől az, hogy a pusztuló állományból származó törzsek fele ehhez az alapvetően proteolitikus fajhoz tartozott, azt jelezheti számunkra, hogy a degradálódó rizoszférában fontosak lehetnek a növényi szövetekből és más forrásokból származó fehérjék hidrolízisében és az aminosavak hasznosításában. Mindazonáltal, mivel a degradálódó növényi részekből legnagyobb részét szénhidrát polimerek szabadulnak fel, ilyen mértékű dominanciájuk a pusztuló nádasok rizoszférájában ezzel nem magyarázható egyértelműen. Az egyik lehetséges ok a tenyésztési eljárásokban kereshető. Az elődúsításra használt tápközegek (főleg az RCM és RMAC levesek) magas fehérje és pepton tartalma ugyanis különösen kedvező volt az ehhez a fajhoz tartozó izolátumok felszaporításához, ami ily módon torzította a természetes környezetek eredeti dominancia viszonyait.

A CP8 és E8 jelölésű törzsek (II-es 16S-RFLP csoport) a *Clostridium bifermentans* fajhoz állnak legközelebb több mint 99,0%-os szekvencia hasonlósággal. Ez a faj Wiegel és mtsai (2006) alapján nem tagja a szigorúan vett *Clostridium* nemzetségnek (5. ábra), mindazonáltal gyakori alkotója mind a talaj és a tavi üledék (Villányi, 1996), mind a különböző eukarióta szervezetek, köztük az emberi bélcsatorna baktérium közösségeinek is

(Drasar és Roberts, 1990). Doi és mtsai (2007) ezt a fajt találták az egyik domináns mikroorganizmusnak a rizs rizoszférájában. A *Clostridium sporogenes*hez hasonlóan jól tűri a lúgos kémhatású közeget, pH 12,2 értéken is növekszik (Karlsson és mtsai, 1988). Egyaránt proteolitikus és szacharolitikus faj. Mindemellett a *Clostridium*ok közül kitűnik azon tulajdonságával, hogy képes bizonyos nitrociklusos és nitroaromás vegyületek bontására. E vegyületek közül néhányat gyomirtó szerként is alkalmaznak, melyek a talajvizet és a környező természetes vizeket is szennyezhetik (Hammil és Crawford, 1996). A *Clostridium bifermentans* fajhoz tartozó csoportok (II-es 16S-RFLP csoport, A és H fenonok, az összes törzs 17%-a) tagjaira a zselatin hidrolízise mellett jellemző volt a glükóz és a mannóz hasznosítása. A fajhoz tartozó két fenotípusos csoport között is jelentkezik a *Clostridium sporogenes* esetében már leírt szétválás. Az A fenon 10 törzse, amelyik közel egyenlő arányban származott az egészséges és pusztuló nádasok rizoszférájából, a fenti szénforrásokon kívül ugyanis csak a maltózt hasznosította (4 törzs esetében). Ezzel szemben a H fenon 7 törzse, amelyik egy kivétellel az egészséges nádasállományból lett izolálva jóval szélesebb cukorhasznosítási spektrummal bírt (az előzőeken felül szalicin, szorbitol és trehalóz fermentáció, lásd a függelék). Továbbá a triptofánból történő indol termelés főként az A fenon törzseire volt jellemző, ahol nagyobb arányban voltak jelen a pusztuló minta izolátumai.

Az E1 jelzésű törzs (IX-es 16S-RFLP és J fenotípusos csoport) 99,8%-os részleges 16S rDNS hasonlósággal a *Clostridium diolis* fajhoz állt a legközelebb, de közel ilyen nagy mértékű (99,4%-os) hasonlóságot mutatott a *Clostridium beijerinckii* DSM 791 típustörzsszel is (5. ábra). Az általunk is vizsgált és a szakirodalomban is közölt fenotípusos jellemzők közül a típustörzsek glicerinnel való fermentációját tekintettük meghatározónak törzseink faji besorolásánál. A *Clostridium diolis* törzsek minden esetben fermentálják a glicerint (Biebl és Spröer, 2002), míg a *Clostridium beijerinckii* törzsek közül nem mindegyik, vagy csak kismértékben hasznosítja azt (Keis és mtsai, 2001). A velencei-tavi E1 és a vele azonos 16S-RFLP csoportban lévő CE11 jelzésű törzsek nem fermentálták a glicerint (függelék), ezért valószínűsíthetjük, hogy azok a *Clostridium beijerinckii* fajhoz tartoznak. A két törzs ezen túlmenően minden lényeges fenotípusos tulajdonságában megegyezett egymással és a típustörzsszel is. A zselatint és az eszkuhint hidrolizálták, továbbá a cukrok többségét képesek voltak növekedésükhöz felhasználni, azonban indol termelést és ureáz reakciót nem mutattak. Fontos megemlítenünk, hogy a fenonhoz tartozó törzsek mind hidrolizálták a cellobiózt is, illetve jelentős részüket cellulóz tartalmú táptalajon neveltük, ami arra utal, hogy az adott környezetben részt vehetnek a cellulóz anaerob lebontásában is.

Az érintett J fenotípusos csoportból a fenti 2 törzsen kívül egy harmadikat (CE5) is kiválasztottunk 16S-RFLP analízishez (éppen a már említett glicerinnel való hasznosítás okán). A CE5 jelzésű és a vele egy belső ágon elhelyezkedő törzsek (CE12, CP15, E16, E18A, CE13, ahogy az 4. ábrán is látható) ugyanis intenzíven fermentálták a glicerint. A CE5 jelzésű törzs az RFLP analízis során is külön csoportba került (III), és a legnagyobb 16S rDNS hasonlóságot (97,3%) a *Tissierella praeacuta* faj típus törzsével mutatta, amelyik megegyezik a korábbi *Clostridium hastiforme* fajjal. Hasonló a helyzet a III-as 16S-RFLP csoport másik tagjával, az AP21 jelzésű törzssel is, esetében azonban a szekvencia hasonlóság még magasabb (99,1%). Mindazonáltal fenntartással kell kezelnünk ezeket az egyezéseket, mert a nemzetség és a faj jelenleg érvényes leírása szerint a *Tissierella praeacuta* nem képez endospórát (Bae és mtsai, 2004), a velencei-tavi törzsek tenyészeiben azonban kivétel nélkül mindenhol megtaláltuk azokat. Az mindenesetre bizonyos, hogy bár filogenetikai alapon nem tartoznak a szigorúan vett *Clostridium* nemzetséghez, ugyanakkor előfordulásukban és számos fenotípusos tulajdonságukban osztoznak azzal. A két reprezentáns törzs eltérő fenotípusos csoportba tartozott. A CE5 jelzésű a J fenonon belüli 6 törzset számláló alcsoportba, az AP21 pedig a mindössze 2 törzs alkotta E fenononba. A csoportok törzseinél általános volt a zselatin és az eszkulin hidrolízise, a maltóz, a mannóz és a cellobióz hasznosítása, de itt is megfigyelhetjük, hogy a J fenonon belül, az egy kivétellel az egészséges rizoszféra mintából izolált törzsek jóval több cukrot hasznosítottak szénforrásként (függelék).

Az előző törzsekhez hasonlóan még két további reprezentáns törzsünk is a III-as 16S-RFLP csoportba került. Mivel a fenotípusos csoportosítás során az előzőektől eltérő fenonon tagjai voltak (CP7 az I fenonon, P24 csoportokon kívül), ezek 16S rDNS-ét is részlegesen megszekvenáltuk. A szekvencia analízisek alapján a CP7 és P24 jelzésű törzsek a talajban és iszapban szintén széleskörűen elterjedt humánpatogén *Clostridium botulinum* E típushoz hasonlítottak a legnagyobb mértékben (>99,0%). A kiterjedt 16S rDNS szekvencia analízisek azonban megállapították, hogy taxonómiaiilag ez a típus valójában nem a *Clostridium botulinum* fajhoz tartozik, csupán a vele kapcsolatban leírt kórkép, a botulizmus egyik típusának (E toxin típus) az okozója az általa termelt neurotoxin révén (Wiegel és mtsai, 2006). A filogenetikai dendrogramon is látható (5. ábra), hogy a *Clostridium botulinum* típus törzse (ATCC 25763) távol esik az E típustól és a velencei-tavi törzsektől egyaránt. Mivel azonban a humán orvoslás szempontjából kiemelt jelentőségű fajról van szó, az elnevezése megmaradt. A többi *Clostridium* típus törzs közül törzsünk a legnagyobb mértékben a *Clostridium uliginosum* (Matthies és mtsai, 2001) fajhoz hasonlítottak, indolt



termeltek és ureáz aktivitást mutattak. Az eszculint hidrolizálták, továbbá bontották a glükózt, mannózt, maltózt, szalicint és még néhány ritkán előforduló szénhidrátot. A két általuk kialakított fenon mindössze 3 törzset foglalt magába, azaz valószínűleg nem túl jelentősek a nádasok rizoszférájában. Mindazonáltal az előzőekben tárgyalt III-as és IX-es 16S-RFLP, valamint I és J fenotípusos csoportok és a fenotípusos csoportokon kívül eső törzsek esetében is látható, hogy a különböző módszerek együttes alkalmazása elősegítette a vizsgált baktériumközösség még pontosabban megismerését.

A IV-es 16S-RFLP csoportba tartozó E9 (D fenon), valamint P21 (F fenon) jelzésű törzseinket *Clostridium glycolicum* fajként azonosítottuk 98,9 illetve 98,8%-os 16S rDNS szekvencia illeszkedéssel. Ez a faj Wiegel és mtsai (2006) alapján szintén nem tagja a szigorúan vett *Clostridium* nemzetségnek (5. ábra). A két fenotípusos csoport a mintavételi helyek alapján vált el egymástól, de ebben az esetben az általunk vizsgált biokémiai tulajdonságokkal ezt nem tudtuk magyarázni, mivel alapvető különbség csak a mannóz és a trehalóz hasznosításában jelentkezett (függelék). A *Clostridium glycolicum*ot a szakirodalomban alapvetően szacharolitikus fajként írták le (Gaston és Stadtman, 1963). Törzseink is jellemzően fermentálták a glükózt és a maltózt, továbbá a 2 fenotípusos csoportban külön-külön a mannózt és a trehalózt is. A cukrok mellett a zselatint és az eszculint is hidrolizálták. Ezt a fajt Küsel és mtsai (2001) hasonló környezetből, a *Halodula wrightii* tengeri fűfélé rizoszférájából már szintén izolálták. Vizsgálataik során bebizonyosodott, hogy egy a rizoszféra környezethez nagymértékben alkalmazkodott fajról van szó. A *Clostridium glycolicum* anoxikus körülmények között glükózon növekedve egyrészt fermentációs úton etanolt képezett, és más anaerob acetogén mikroorganizmusokhoz hasonlóan képes volt a keletkező redukáló erőt (NADH) a Ljungdahl–Wood (acetyl-CoA) úton (CO<sub>2</sub> és H<sub>2</sub> felhasználásával) acetát képzésére fordítani. Másfelől viszont egészen magas oxigén koncentrációk (6 térfogatszázalék O<sub>2</sub> a rázatott tenyészet feletti légterben) mellett is képes volt növekedni, de ekkor anyagcsere folyamatait a különösen oxigén érzékeny acetyl-CoA útról meghatározóan az etanolt, tejsavat és hidrogént termelő fermentációra váltotta át. Ilyenkor az oxigén érzékenységi mérséklésében valószínűleg szuperoxid-dizmutáz, peroxidáz és NADH-oxidáz enzimekészlete segítette, amelyeket Küsel és mtsai szintén kimutattak a citoplazmájából. Irodalmi adatok szerint (Hippe és mtsai, 1992) ez a faj lassú cellulóz degradációra is képes. A velencei-tavi tenyészetek azonban nem mutattak cellobióz értékesítést, aminek az lehet az oka, hogy a képességük a tenyésztés során feltehetően gátlódott, mivel a cellulóznál számos könnyebben hasznosítható táplálékforrás is jelen volt a

táptalajban. Sokoldalú képességei miatt nem meglepő tehát, hogy a két fenon révén összes törzsünk 14%-át ehhez a fajhoz tartozónak tekinthetjük.

A VIII-as 16S-RFLP csoportba tartozó és a fenotípusos csoportokon kívül eső CE6 jelzésű törzs *Clostridium carboxidivorans* fajnak bizonyult 98,5%-os 16S rDNS hasonlósággal. Tenyészetében nem találtunk endospórát. Zselatináz aktivitást nem mutatott, az eszkulint azonban bontotta. A szénhidrátok közül a glükózt, a mannózt, az arabinózt és a ramnózt hasznosította. Jellemző volt még rá az indol termelés és az ureáz aktivitás. Ezt az elsősorban acetogén és nagy mennyiségű alkohol (etanol és butanol) termelésére képes (az angolszász szakirodalomban, mint „solvent-producing”) *Clostridium* fajt (Liou és mtsai, 2005) törzseink között csupán ez az egyetlen izolátum képviselte.

A P9 jelzésű törzs a II-es 16S-RFLP csoportba tartozott a már tárgyalt *Clostridium bif fermentans* törzsekkel együtt. Mivel azoktól fenotípusosan elkülönült 16S rDNS-ét részlegesen megszekvenáltuk, de az alacsony szekvencia hasonlóság miatt nem tudtuk faji szinten azonosítani. A legnagyobb (93,8%-os) hasonlóságot a leírt fajok közül a *Clostridium acetobutylicum* fajjal mutatta, amelyik kiemelt jelentőséggel bír ipari alkalmazásai („solvent-producing” baktérium) és sokrétű biopolimer (cellulóz, keményítő, pektin, xilán) bontó képessége révén (Keis és mtsai, 2001). Törzsünket a *Clostridium acetobutylicum* fajtól elkülöníti, hogy nem hidrolizálja a zselatint és az eszkulint, triptofánból nem képez indolt, és nem hasznosítja a cellobiózt. A fenotípusos különbségek és az alacsony szekvencia hasonlóság miatt tehát feltételezhetjük, hogy egy új faj képviselőjére bukkantunk. A P9 is az általa képviselt faj egyetlen izolátuma a törzseink között.

A VI-os 16S-RFLP csoport P12 jelzésű reprezentáns törzse a legnagyobb (94,4%-os) 16S rDNS hasonlóságot a leírt fajok közül a *Clostridium argentinense* (Suen és mtsai, 1988) típustörzsével mutatta. Feltételezhetően itt is új fajhoz tartozó törzset sikerült izolálnunk a nád rizoszférájából. A fenotípusos csoportosítás alapján a B csoportba került, amelynek másik reprezentáns törzse viszont az I-es 16S-RFLP csoportba tartozik. Ezek alapján a B fenotípusos csoporton feltehetőleg a *Clostridium sporogenes* fajjal együtt osztozik. Hogy a csoportot alkotó többi 4 törzs melyik fajhoz tartozik pontosan, azt a fenotípusos jellemzők alapján nem lehet egyértelműen megállapítani, ehhez a teljes csoport molekuláris biológiai jellemzésére volna szükség.

Az utóbb jellemzett két törzs (P9 és P12) feltételezhetően még ezidáig nem leírt, a tudomány számára új faj képviselője. Ahhoz azonban, hogy erről megbizonyosodjunk, és a törzseket új fajokként leírassuk, a polifázikus taxonómia kívánalmainak megfelelően még további részletes vizsgálatokra van szükség, mint teljes szekvencia analízis a 16S rDNS

régióra, DNS-DNS hibridizáció, valamint további morfológiai és kemotaxonómiai vizsgálatok.

A VII-es 16S-RFLP csoportba tartozó és a fenotípusos csoportokon kívül eső P8B jelzésű törzs 98,6%-os szekvencia-egyezéssel a cellulózbontó *Clostridium celerecrescens* (Palop és mtsai, 1989) fajhoz állt legközelebb, szintén a szigorúan vett, „valódi” *Clostridium*ok körén kívül. Ezen a filogenetikai ágon találjuk a *Desulfotomaculum guttoideum* Gram-pozitív, spóráképző szulfátredukáló baktérium típustörzsét is (5. ábra), amelyet Stackebrandt és mtsai (1997) szerint nagy valószínűséggel tévesen klasszifikáltak, és valójában nem szulfátredukáló baktérium. Mindazonáltal pontos taxonómiai helyzetét azóta sem rendezték. A velencei-tavi törzsnél a szulfátredukáló baktériumok számára készített tápközegekben szulfátredukációt nem lehetett megfigyelni, de a biokémiai tesztekben a zselatint és az eszculint hidrolizálták, valamint a glicerint és a cukrokat (glükóz, maltóz, szalicin, mannóz) egyaránt intenzíven fermentálták.

### **7.3. TENYÉSZTÉSBE VONT SZULFÁTREDUKÁLÓ BAKTÉRIUMOK A VELENCEI-TÓ NÁD RIZOSZFÉRÁJÁBAN**

A 2002. júniusi mintavételt követően az egészséges és pusztuló rizoszféra mintákat vegyessavas PMB táplevesben dúsítottuk. Ennek hígításából azután azonos összetételű táplemezekre szélesztettünk és 28 törzset izoláltunk. Ezek közül hetet sikerült hosszú távon is fenntartani, elsősorban dúsító levesekben: négyet az egészséges (EV2, EV5, EV7, EV8), hármat a pusztuló nádas rizoszférájából (PV5, PV6, PV7). Mind a hét törzsből sikerült DNS-t izolálni és 16S rDNS PCR terméket előállítani. A 16S rDNS RFLP analízise nem mutatott különbséget közöttük, így a pusztuló és az egészséges nádas területéről származó mintákból is egyet-egyet szekvenáltunk meg: az EV5-öt és a PV6-ot. A szekvencia analíziseket követően a két törzs egymással 100,0%-os, a *Desulfovibrio alcoholivorans* fajjal 98,5%-os hasonlóságot mutatott, azaz egy fajba tartoztak. Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy a 2002. júniusi mintavétel során az egészséges és pusztuló nádasok rizoszférájából izolált törzsek egyaránt a *Desulfovibrio alcoholivorans* fajhoz tartoztak. A munka és időigényes tenyésztési eljárásokkal tehát a 2002. júniusi mintából nem sikerült az előzetes feltételezéseinknek megfelelő, részletgazdag képet kapnunk a nád rizoszféra szulfátredukáló baktérium közösségéről. Ennek oka legfőképpen az, hogy lassú növekedésük és speciális igényeik miatt a SRB egyébként is nehezen vonhatók tenyésztésbe (Wieringa és mtsai, 2000), és ezzel összefüggésben valószínűsíthető, hogy az általunk alkalmazott tenyésztési módszerek nem feleltek meg a közösséget alkotó legtöbb faj számára. Emiatt a 2004. júniusi

mintavételhez kapcsolódóan a tenyésztés módszertanát az alábbiak szerint változtattuk meg. A PMB táplevesben szénforrásként egyedül tejsavat alkalmaztunk a vegyes savas tápleveshez képest nagyobb mennyiségben, mivel ez egy általánosan és könnyen hasznosítható szénforrás a szulfátredukáló baktériumok számára, és a csíraszámbecslések eredményei is arra utaltak, hogy a tejsavon, mint egyedüli szénforráson növekedni képes SRB alkotják a tenyésztésbe vonható szulfátredukáló közösség számottevő részét. A mintát a törzsek izolálását megelőzően nem közvetlenül dúsítottuk fel, hanem az elődúsítást az MPN módszer számára PMB táplevesekben kihígított minta hígítási tagjaiban végeztük el. Ezt az eljárást azért tartottuk célravezetőnek, mert így az utolsó párhuzamos hígítási tagokban, a mintában jelenlévő domináns baktérium fajok is elkülönülhettek. Ily módon csökkentettük annak az esélyét, hogy más domináns, vagy akár kevésbé domináns, de az alkalmazott tápközegben erőteljesebb növekedésre képes fajok túlnőhessék a többi. Végül a törzsek izolálásához a megfelelő mértékben hígított dúsító levesekben nem táptalaj lemezek felületére szélesztettünk, hanem a hígítási tagokat agaröntéses technikát alkalmazva a táptalajlemezek belsejében oszlattuk el. Korábban azt tapasztaltuk ugyanis, hogy az izolált törzseket is nehéz volt fenntartani újabb táptalaj felületre történt áttöltéssel, ami miatt a 2002. júniusában izolált törzseink jó részét még a vizsgálatok megkezdése előtt elvesztettük. Táplevesekbe oltva már könnyebben fenn tudtuk azokat tartani, valószínűleg a kiegyensúlyozottabb ozmotikus közeg és a tápközeg belsejének optimálisabb redox viszonyai miatt. Ezért 2004. júniusában, a megfelelő mértékben kihígított pozitív MPN hígítási tagokat már alacsonyabb agartartalmú (1,3%) PMB lemezek belsejébe öntve inkubáltuk a törzsek izolálását megelőzően.

Az MPN hígítások legnagyobb pozitív hígítási tagjaiból összesen 59 szulfátredukáló baktériumot izoláltunk, melyekből 47-et sikerült tiszta tenyészetben fenntartani. Mivel izolátumaink a környezeti minta legnagyobb hígítású tagjaiból származtak, kijelenthetjük, hogy azok az általunk használt tejsavas (Na-laktátos) táptalajon a rizoszféra valószínűleg leggyakoribb tenyésztésbe vonható szulfátredukáló baktériumai. A 47 törzsből 38 származott hőkezelés nélkül indított MPN sorozatból (LVS1-LVS48). A fennmaradó 9 törzset (LVS49-LVS59) azonban hőkezelt mintából tenyésztettük ki. A törzsek PCR reakcióban felszaporított 16S rDNS szakaszain végzett RFLP analízis (ARDRA) alapján azok négy 16S-RFLP csoportot képeztek. A feltételezeten nagyobb diverzitás feltárása érdekében izolátumaink felszaporított *dsrAB* génszakaszain is RFLP analízist végeztünk, ami 7 különböző *dsr*-RFLP csoportot eredményezett. Az így előálló csoportokból a továbbiakban reprezentánsokat választottunk, és elvégeztük azok 16S rDNS és *dsrA* génjének parciális szekvenálását. A genotipizálás és a szekvencia analízisek eredményeit a 10. táblázat tartalmazza.

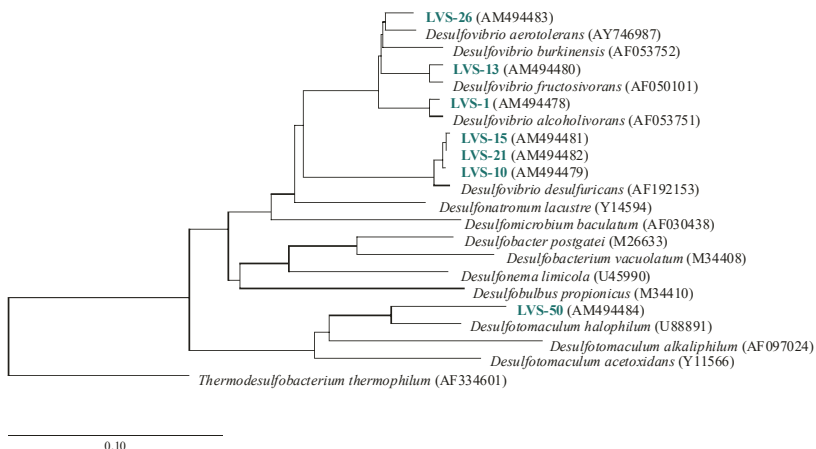
16S-RFLP csoport (törzsek száma)	dsr-RFLP csoport (törzsek száma)	Reprezentatív törzs	A GenBank adatbázisban a legközelebbi rokon leírt faj azonosító szám, %-os hasonlóság		
			16S rDNS	dsr-DNS	Dsr-protein
I (13)	1 (11)	LVS-1	<i>Desulfovibrio alcoholivorans</i> AF053751, 99,0%	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF418187, 90,9%	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF418187, 95,6%
	2 (2)	LVS-26	<i>Desulfovibrio aerotolerans</i> AY746987, 97,2%	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF418187, 91,0%	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF418187, 94,3%
II (6)	3 (6)	LVS-13	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF050101, 98,8%	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF418187, 97,6%	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF418187, 98,8%
III (19)	4 (12)	LVS-10	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> AF192153, 98,5%	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> AF273034, 95,9%	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> AF273034, 97,9%
	5 (2)	LVS-15	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> AF192153, 98,7%	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> AF273034, 96,6%	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> AF273034, 99,6%
	6 (5)	LVS-21	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> AF192153, 98,5%	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> AF273034, 97,5%	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> AF273034, 99,2%
IV (9)	7 (9)	LVS-50	<i>Desulfotomaculum halophilum</i> U88891, 91,3%	<i>Desulfotomaculum halophilum</i> AY626024, 90,2%	<i>Desulfotomaculum halophilum</i> AY626024, 93,8%

10. táblázat. A velencei-tavi Lángi-tisztás nádas állományának rizoszférijából kitenyészett törzsek genotipizálásának eredményei (16S rDNS és dsr-DNS RFLP analízis, parciális szekvencia analízis)

A reprezentatív törzsek 16S rDNS szekvencia szakaszainak és a közeli rokon referencia szekvenciáknak (GenBank) a bevonásával filogenetikai dendrogramot is szerkesztettünk (6. ábra). Emellett elkészítettük a rokonsági kapcsolatokat disszimilatórikus szulfít reduktáz alapon szemléltető filogenetikai fát is a parciális *dsrAB* (*dsrA*) génszekvenciáikat aminosav sorrendre fordítva (parciális DsrA szekvenciák). Ez utóbbi dendrogramon a törzsek DsrA szekvenciáit együtt tüntettük fel a közösségi *dsrAB* készlet klónozásával nyert szekvenciákkal (11. ábra).

A dsr-RFLP részben tovább bontotta a 16S-RFLP (ARDRA) által létrehozott 4 csoportot. Ez az első 16S-RFLP csoport (I) esetében faji szinten jelentkezett (LVS-1: *Desulfovibrio alcoholivorans*, 99,0% és LVS-26: *Desulfovibrio aerotolerans*, 97,2%), a harmadik csoportnál (III) pedig faji szint alatti genetikai diverzitást tárt fel (LVS-10, LVS-15 és LVS-21: *Desulfovibrio desulfuricans* 98,7, 98,5 és 98,5%-os hasonlósági szinteken). A II (LVS-13: *Desulfovibrio fructosivorans*, 98,8%) és IV (LVS-50: *Desulfotomaculum halophilum*, 97,2%) 16S-RFLP csoportokba tartozó törzseknel a dsr-RFLP analízis nem eredményezett további szétválást. Eredményeink azt mutatják, hogy a *dsrAB* génen végzett RFLP analízis eredményesebbnek mutatkozott a közeli rokon SRB fajok diverzitásának feltárásában, mint az általánosan elterjedt és használt 16S rDNS ARDRA. Ez egyrészt azzal magyarázható, hogy a *dsrAB* gén majdnem egyharmadával hosszabb (körülbelül 1900 bp), mint a 16S rDNS szakasz (körülbelül 1500 bp), másrészt mivel a *dsrAB* gén egy enzimfehérjé kódoló régió, nagyobb variabilitást hordozhat a kodonok degenerált harmadik bázisaiban (harmadik „löttyögő bázis”).

Ahogy az 10. táblázatban és az 6. ábrán is látható, a hőkezelés nélküli mintából izolált és azonosított SRB törzsek mindegyike a delta-Proteobaktériumok körén belül, a *Desulfovibrio* nemzetség 4 különböző fajához tartozik viszonylag nagy (> 97,0%) parciális 16S rDNS hasonlósági szinten. A hőkezelt mintából származó törzseknél a kombinált RFLP analízis sem eredményezett szétválást, a választott csoport reprezentáns (LVS-50) a kis G+C tartalmú Gram-pozitív baktériumok *Desulfotomaculum* nemzetségének egyik fajával mutat viszonylag alacsony (91,3%) parciális 16S rDNS hasonlóságot. Ebben az esetben feltételezhetően egy új szulfátredukáló baktérium faj képviselőjét sikerült izolálnunk a Velencei-tó nád rizoszférájából.



6. ábra. A velencei-tavi Lángi-tisztás nádas állományának rizoszférájából kitenyészített SRB törzsek és a legközelebbi rokon baktériumfajok parciális 16S rDNS szekvenciáin alapuló neighbour-joining filogenetikai fa  
(A faj, illetve törzs neveket a hozzájuk tartozó szekvenciák GenBank azonosító számai követik; a méretarány 10% nukleotid különbséget jelöl.)

A 7 reprezentatív SRB törzs esetében elvégeztük 10 alapvető szénforrás oxidatív, illetve fermentatív hasznosításának tesztjét is, hogy feltárjuk az azok közötti esetleges fiziológiai heterogenitást, valamint információkat nyerjünk a valószínűsíthetően új fajhoz tartozó Gram-pozitív endospórás SRB (LVS-50) szénforrás hasznosító képességéről. A 10 szénforrás hasznosítása alapján 6 különböző mintázatot sikerült elkülöníteni a csoport reprezentánsok között (11. táblázat). A szulfátredukáló baktériumok szénforrás hasznosítási vizsgálata – figyelembe véve a bonyolult kivitelezésű szintetikus táplevés alkalmazását, a

viszonylag hosszú inkubációs periódusokat, valamint a vas-szulfidos detektálás érzékenysége miatt alkalmazott háromszori tenyésztet passázst, – meglehetősen munka- és időigényes folyamat, ezért ezt csak a csoport reprezentánsok vizsgálatára korlátoztuk.

RFLP csoportok <i>dsrAB</i>		I		II	III			IV
		1	2	3	4	5	6	7
Csoportreprezentánsok		LVS-1	LVS-26	LVS-13	LVS-10	LVS-15	LVS-21	LVS-50
Acetát	szulfát redukció	-	-	-	-	-	-	-
	fermentáció	-	-	-	-	-	-	-
Laktát	szulfát redukció	+	+	+	+	+	+	+
	fermentáció	-	-	-	gy	gy	gy	-
Piruvát	szulfát redukció	+	+	+	+	+	+	+
	fermentáció	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	szulfát redukció	+	+	gy	+	+	+	+
	fermentáció	-	-	-	-	-	-	-
Alanin	szulfát redukció	-	-	-	-	-	-	+
	fermentáció	-	-	-	-	-	-	-
Fruktóz	szulfát redukció	-	+	+	-	-	-	-
	fermentáció	-	+	+	-	-	-	-
Glükóz	szulfát redukció	-	gy	-	-	-	-	-
	fermentáció	-	-	-	-	-	-	-
Malát	szulfát redukció	+	+	+	+	+	+	+
	fermentáció	+	+	+	+	-	-	-
Fumarát	szulfát redukció	+	+	+	+	+	+	-
	fermentáció	+	+	+	-	-	-	-
Szukcinát	szulfát redukció	+	-	-	-	-	-	-
	fermentáció	-	-	-	-	-	-	-

11. táblázat. A velencei-tavi Lángi-tisztás nádas állományának rizoszférijából kitenyésztett reprezentatív SRB törzsek szénforrás hasznosítási mintázata  
(+: növekedés, -: nincs növekedés, gy: gyenge növekedés)

A szekvencia analízisek eredményének ismeretében nem volt meglepő, hogy a vizsgált törzsek mindegyike részlegesen oxidáló (az angol nyelvű szakirodalomban, mint „incomplete”, vagy „nonacetate” oxidáló) szulfátredukáló baktériumnak bizonyult. Ezek a szervezetek nem képesek az összetettebb szénforrások teljes lebontására, azokat csak acetátig oxidálják, ami nem csak az általunk azonosított fajokra, hanem a *Desulfovibrio* nemzetség valamennyi tagjára egyaránt jellemző sajátosság. A *Desulfotomaculum* nemzetség esetében szintén ez jellemző a fajok többségére, mindazonáltal itt már megtalálhatjuk az acetyl-CoA úton megvalósuló terminális oxidációt és az ezzel kapcsolatos acetát hasznosítás képességét is a *Desulfotomaculum acetoxidans* esetében. Ez utóbbi felfedezés a nemzetség újbóli leírásához vezetett (Widdel és Pfennig, 1977). Ez indította minket is arra, hogy a reprezentatív törzsek és különösen az LVS-50 esetében teszteljük az acetát hasznosításának képességét. A

tesztek eredményei alapján végül ez utóbbi törzs is részlegesen oxidáló szulfátredukáló baktériumnak bizonyult.

A többi szénforrás hasznosítását számba véve, az összes törzs hasznosította a tejsavat (laktát), a piroszlósavat (piruvát), az etanolt és az almasavat (malát) disszimilatórikus szulfátredukcióval kapcsolatban. A *Desulfotomaculum* törzs (LVS-50) kivételével mindegyik oxidálta a fumarosavat (fumarát). Az alanin hasznosítás azonban csak ez utóbbi törzsről volt jellemző. Két törzs (LVS-13 és LVS-26) volt képes fruktózon, mint egyedüli szénforráson növekedni szulfátredukcióhoz kapcsolatban. Egyiküket (LVS-13) mint *Desulfovibrio fructosivorans*-t azonosítottuk megbízhatóan magas parciális 16S rDNS hasonlósági szinten (98,8%), míg a másik törzs (LVS-26) a *Desulfovibrio aerotolerans*-hoz állt a legközelebb 97,2%-os hasonlósággal (10. táblázat). Az LVS-26 azonban néhány fontos fiziológiai tulajdonságban eltért a *Desulfovibrio aerotolerans* DV05<sup>T</sup> típus törzstől (Mogensén és mtsai, 2005), úgymint az almasav és a fruktóz disszimilatórikus szulfátredukció révén történő hasznosításában. Az általunk izolált törzs még glükózt is hasznosított ilyen módon, habár a vas-szulfid csapadékos detektálás alapján jóval kisebb mértékben, mint a többi felkínált szénforrást. Az egyetlen reprezentatív törzs, amelyik képes volt a borostyánkősav (szukcinát) oxidálására az LVS-1 volt, amit a szekvencia analízisek alapján 99,0%-os hasonlósággal *Desulfovibrio alcoholivorans*-ként azonosítottunk. A fermentációs képesség tekintetében a piroszlósavat mindegyik törzs tudta hasznosítani fermentatív úton is. Nagyon gyenge tejsav fermentációt lehetett detektálni az LVS-10, LVS-15 és LVS-21 törzsek esetében. Ezek a közel rokon törzsek (mind *Desulfovibrio desulfuricans* >98,0% hasonlósági szinten) majdnem teljesen megegyeztek szénforrás hasznosítási mintázatuk alapján, egyedül az LVS-10 vált el a másiktól malát fermentációs képessége révén. A malát fermentációt a fumarát fermentációjával együtt más törzseknél is meg lehetett figyelni, a fruktóz fermentálását azonban csak annál a két törzsnél észleltük, amelyek képesek voltak azt disszimilatórikus szulfátredukció révén is hasznosítani.

A fentiekben részletezett törzsek mindegyike az MPN sorozatok legnagyobb, még pozitív hígításaiból származott, így azok a rizoszféra környezetben legnagyobb számban előforduló, és feltehetően a tenyésztésbe vonható szulfátredukáló baktériumok legjelentősebb képviselőinek tekinthetők. A hőkezelés nélküli MPN hígításokból származó csoport reprezentánsok a szekvencia analízisek alapján mind az édesvízi környezetekben széles körben elterjedt *Desulfovibrio* szulfátredukáló nemzetséghez tartoznak (Bak és Pfennig, 1991). Képviselőiket édesvízi növények rizoszférájában is detektálták már mind tenyésztésen alapuló (Borsodi és mtsai, 2003), mind molekuláris biológiai módszerekkel (Acha és mtsai,



2005). Mindezek mellett a *Desulfovibrio* fajokról leírták, hogy viszonylag magasabb oxigén koncentrációt is képesek tolerálni (Cypionka, 2000), ami számukra jelentős szelektív előnyt jelenthet a nád rizoszférajában.

A *Desulfovibrio* nemzetséghez tartozó izolátumok fele (III/4 - III/5 - III/6 RFLP csoportok, lásd az 10. táblázatot) a *Desulfovibrio desulfuricans* fajhoz tartozik megbízhatóan magas 16S rDNS hasonlósági szinten. A kiemelt csoport reprezentánsok osztoztak a típustörzs általunk is vizsgált közös anyagcsere jellemzőiben, de az LVS-10 által képviselt legnagyobb csoport esetében egy kis különbséget is sikerült felfedni a szénforrás hasznosítási spektrumban. Mindez alátámasztja azt a korábbi megállapításunkat, hogy a *dsrAB* génen végzett RFLP analízis kellően érzékeny módszer nemcsak a közel rokon fajok, hanem esetleges faj alatti szintek elválasztásában is. Ez azért válik különösen jelentőssé ebben az esetben, mivel ily módon a szulfátredukáló baktérium közösség anyagcsere potenciáljáról is részletgazdagabb képet rajzolhatunk. Itt kell megjegyeznünk azt is, hogy csak ezeknek a törzseknek a tenyészeiben sikerült kismértékű tejsav fermentációs aktivitást kimutatni. Korábbi munkák beszámolnak róla, hogy *Desulfovibrio desulfuricans* tenyészetek esetében a tejsav és etanol fermentáció aktívan végbemegy  $H_2$  (mint redukáló erő) felszabadulása mellett, de csak nagyon alacsony hidrogén parciális nyomáson, ami azonban anaerob mikrokörnyezetekben gyakran kialakulhat hidrogént fogyasztó prokarióták, mint például a homoacetogén *Clostridium* fajok és a metanogén baktériumok aktivitásának eredményeképpen (Bryant és mtsai, 1977). Munkánk során a fermentálható szénforrások esetleges szintróf hasznosítását ilyen módon nem vizsgáltuk, de maga a folyamat nagy jelentőséggel bírhat olyan alacsony szulfát koncentrációjú környezetekben, ahol szulfátredukáló és hidrogénfogyasztó baktérium populációk együttesen vannak jelen (Chartrain és Zeikus, 1986; Kremer és mtsai, 1988).

A hőkezelés nélküli velencei-tavi mintából származó törzsek másik fele (I/1 - I/2 - II/3 RFLP csoportok) három különböző *Desulfovibrio* fajhoz tartozik. Ez a három faj a *Desulfovibrio alcoholivorans*, a *Desulfovibrio fructosivorans* és a *Desulfovibrio aerotolerans*. Ahogy az a filogenetikai dendrogramon is látszik (6. ábra), a három törzs közeli rokona egymásnak és a nemzetségben belül egy viszonylag különálló csoportot formálnak a *Desulfovibrio burkinensis* fajjal együtt. Közülük a *Desulfovibrio alcoholivorans* már a 2002. júniusi rizoszféra mintából is előkerült, mint egyedüli izolátum, valamint sikerült azonosítanunk egy korábbi, szintén a velencei-tavi nádasok rizoszférajához kapcsolódó munka során is (Borsodi és mtsai, 2003). A csoport már leírt tagjaira közösen jellemző, hogy a klasszikusnak mondható elektrondonorokon (mint például a tejsavon, a fűmársavon, az

almasavon, a piroszölösavon) kívül képesek speciális szubsztrátokat is hasznosítani. A *Desulfovibrio alcoholivorans* fajt először egy alkoholgyártó és feldolgozó üzem szennyvizét kezelő ipari fermentorból izolálták, és kitűnt glicerín, 1,2- és 1,3-propándiol hasznosító képességével (Qatibi és mtsai, 1991). A *Desulfovibrio fructosivorans* pedig egyike azon kevés szulfátredukáló baktériumoknak, amelyek képesek szénhidrátokat (jelen esetben fruktózt) hasznosítani mind disszimilatórikus szulfát redukció, mind fermentáció révén (Olliver és mtsai, 1988). A *Desulfovibrio aerotolerans* fajhoz közel álló törzsünk (LVS-26) szintén rendelkezik ezzel a képességgel, mindemellett esetében még nagyon gyenge glükóz hasznosítást is meg lehetett figyelni. Annak ellenére tehát, hogy ez utóbbi törzsünk viszonylag nagy (97,2%) 16S rDNS homológiát mutatott egy már leírt fajjal, egyedi és a SRB körén belül ritka szénforrás hasznosítási képességei alapján mégis feltételezhető, hogy egy új, ezidáig még le nem írt faj képviselője lehet. Említést érdemel továbbá, hogy a jelen vizsgálatból származó bakériumtörzs 16S rDNS szakasza különösen nagymértékű (99,0%-os) egyezést mutat egy környezeti *Desulfovibrio* klón szekvenciájával, amelyik egy francia bordesztyilláló üzem anaerob hulladékemésztő fermentorából származik. Izolált törzseink éppen a fent említett specifikus szénforrás hasznosító képességeik révén lehetnek sikeresek a nád rizoszférájában, ahol egyrészt a gyökér exudátumok összetétele, másrészt a tömegesen jelen lévő fakultatív és obligát anaerob fermentálók fermentációs végtermékei biztosítják a hasznosítható tápanyag kínálatot. Egy ilyen környezetben ugyanis azon szulfátredukáló baktériumok, melyek az általánosan jellemző szubsztrát hasznosításon túl valamilyen speciális szénforrás hasznosításának a képességével is rendelkeznek, szelektív előnyt élvezhetnek más SRB-kal szemben.

A *Desulfovibrio* törzsek mellett 9 spóráképző SRB törzset is sikerült izolálnunk a hőkezelt rizoszféra minta MPN hígításaiból. A törzsek mindegyike egy csoportba tartozott mind a 16S rDNS, mind a *dsrAB* gén RFLP analízise alapján (10. táblázat). A 16S rDNS parciális szekvencia analízisét követően a csoport reprezentáns törzs (LVS-50) a legnagyobb hasonlóságot a *Desulfotomaculum halophilum* fajjal mutatja, de vele is csak 92,6%-os hasonlósági szinten. A feltételezhetően új spóráképző SRB faj részlegesen oxidáló szulfátredukáló baktériumnak bizonyult és osztozott a többi törzsünkkel az általános szénforrások (tejsav, piroszölösav, etanol, almasav) hasznosításában, nem hasznosította azonban egyik felkínált egyszerű szénhidrátot sem, ugyanakkor egyedülként volt képes a vizsgálatba vont aminosav, az alanin hasznosítására szulfátredukció révén. Mindazonáltal a csíraszám eredmények alapján (lásd 7.1.) nem valószínűsíthető, hogy a nád rizoszférájában, együtt más *Desulfotomaculum* fajokkal, különösebb jelentőséggel bírna; lehetséges, hogy

számára a rizoszféra részlegesen aerob környezete nem tolerálható és ott csak endospórák formájában fordul elő.

## **7.4. SZULFÁTREDUKÁLÓ BAKTÉRIUMOK KIMUTATÁSA TENYÉSZTÉSTŐL FÜGGETLEN MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZERREL**

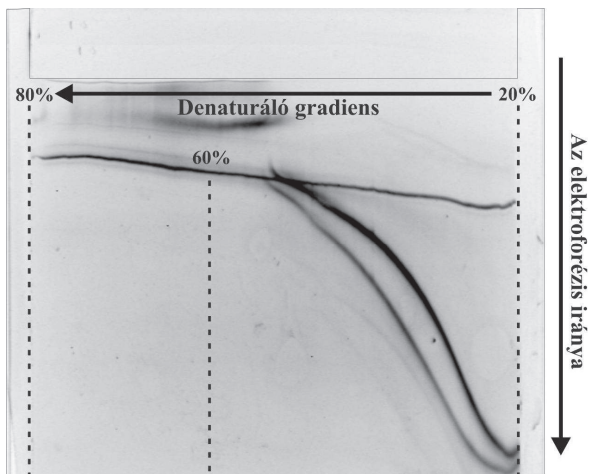
### **7.4.1. A *DESULFOVIBRIO* – *DESULFOMICROBIUM* CSOPORT TAGJAINAK KIMUTATÁSA DGGE SEGÍTSÉGÉVEL**

A DGGE optimalizálását a 2002. júniusi mintából izolált EV5 jelzésű és *Desulfovibrio alcoholivorans* fajként azonosított, valamint egy korábbi munkánkból származó S14 jelzésű, a legnagyobb 16S rDNS hasonlóságot a *Desulfovibrio burkinensis* fajjal mutató törzs (Borsodi és mtsai, 2003) izolált genomi DNS-ével végeztük. A DGGE módszert először a *Desulfovibrio* – *Desulfomicrobium* nemzetségekbe tartozó szulfátredukáló baktériumokra szerettük volna optimalizálni. Eddigi izolátumaink is mind ebből a körből származtak, valamint a tavak üledékében (Sass és mtsai, 1998), a rizs rizoszféra környezetében (Wind és mtsai, 1999) és tengeri, de oxikus üledék rétegekben (Wieringa és mtsai, 2000) végzett vizsgálatok alapján is az ebbe a csoportba sorolható fajokat vártuk a legdominánsabb szulfátredukáló baktériumoknak.

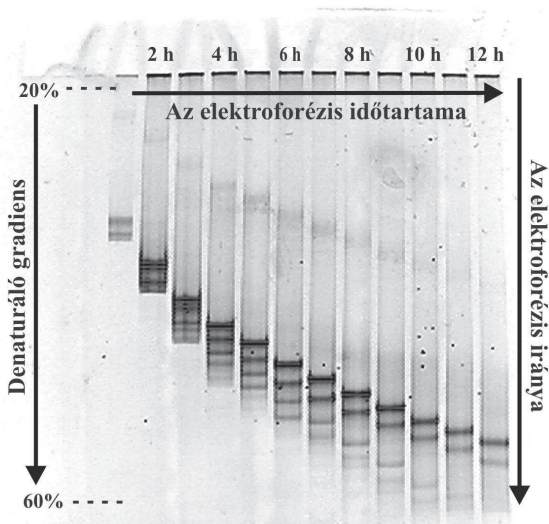
A specifikus PCR reakciók során előállítottuk a két *Desulfovibrio* faj (mint modell szervezetek) GC-kapcsoló 16S rDNS keverékét. Ezt használtuk a DGGE futtatásokhoz. A merőleges koncentráció gradiensű gélen látható szigmoid görbe (7. ábra) jól mutatja, hogy a két faj adott 16S rDNS szakasza legjobban a 20 és 60%-os denaturáló koncentrációk között válik el, így ezt a tartományt választottuk a későbbi rizoszféra mintákon végzett vizsgálatainkhoz.

A következő, úgynevezett „time-travel” futtatás során a két faj 16S rDNS keverékét különböző időintervallumokon keresztül futtattuk az elektroforézis irányával párhuzamos denaturáló koncentráció gradiensű gélben (8. ábra). Az ábrán látható, hogy a két különböző fajhoz tartozó PCR termék legjobban 12 óra után vált el egymástól anélkül, hogy azok a denaturáló gélből kifutottak volna. Az erősebb csíkok alatt megjelenő halványabb csíkok valószínűleg a teljesen szétvált, már egyszálú DNS-eknek tulajdoníthatók, de ezek 12 óra elteltével a gélből láthatóan kifutottak, és így nem zavarták a gélkép értelmezését. Ugyanezt a „time-travel” DGGE vizsgálatot megismételtük 20 és 70%-os denaturáló koncentrációk között. Ebben az esetben a valószínűsíthetően egyszálú formák még 12 óra futtatást követően is bennmaradtak a gélben, továbbá az egyes fajokra jellemző DNS szakaszok szétválása is

kiseb mértékű volt. Mindez szintén megerősített minket a 20 és 60%-os szélső denaturáló koncentrációk alkalmazásában a vizsgált 16S rDNS szakaszok esetében.

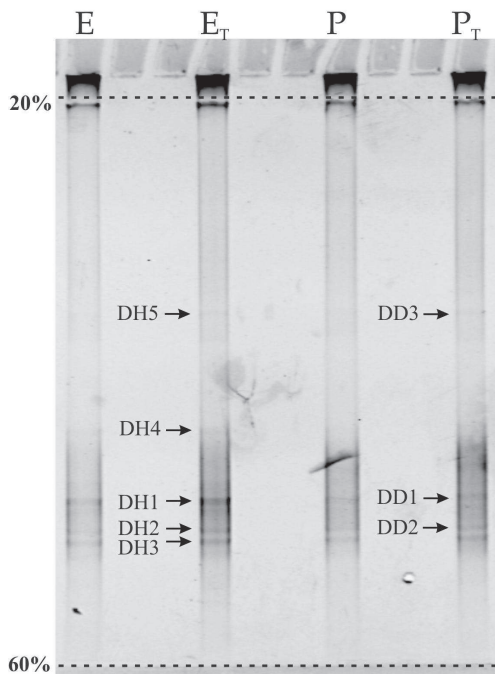


7. ábra. A két *Desulfovibrio* faj specifikus PCR reakciókban felszaporított GC-kapcsos 16S rDNS szakaszain végzett merőleges koncentráció gradiensű DGGE eredménye



8. ábra. A két *Desulfovibrio* faj specifikus PCR reakciókban felszaporított GC-kapcsos 16S rDNS szakaszain végzett „time-travel” DGGE eredménye

A DGGE optimalizálás alapján a 2002. októberében vett egészséges és pusztuló rizoszféra mintákból specifikus PCR reakciókban felszaporított közösségi 16S rDNS szakaszokat 20-60%-os denaturáló koncentráció gradiensű gélben futtattuk 12 órán át 100V feszültség alkalmazása mellett. A felszaporított specifikus PCR termékeket közvetlenül, és két ugyanolyan PCR reakció termékét együttesen tisztítva és koncentrálnva is felvittük a géltre. A gél képén (9. ábra) jól látszik, hogy a tisztított és koncentrált PCR termékek (E<sub>T</sub>, P<sub>T</sub>) futtatása erősebb csíkokat eredményezett, így a továbbiakban csak ezekkel dolgoztunk. A pusztuló és az egészséges nádas rizoszférájából származó mintázat rendkívül hasonló volt, mégis – párhuzamosoknak használva őket – mindkettőből vágunk ki csíkokat. A DH1, DH2, DH3, DH4 és DH5 jelzésű csíkok az egészséges, a DD1, DD2 és DD3 jelzésűek a pusztuló nádas rizoszféra mintájából származtak.

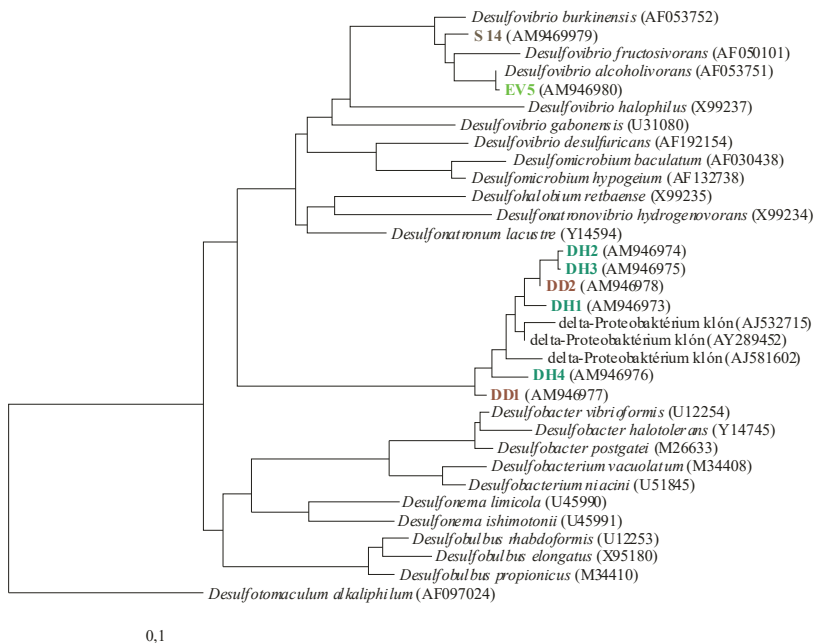


9. ábra. A 2002. októberében vett egészséges és pusztuló nád rizoszféra mintákból specifikus PCR reakciókban felszaporított közösségi 16S rDNS szakaszok

DGGE futtatásának eredménye

(E az egészséges, P a pusztuló minta jelölése, a T alsó index a futtatást megelőzően tisztított és koncentrált PCR termékre utal; DH1-DH5 és DD1-DD3 a gélből kivágott csíkok)

A DH5 és DD3 jelzésű csíkokból csak nagymértékben kevert, a szekvencia analízis számára értelmezhetetlen szekvenciákat sikerült előállítani. A többi csík esetében azonban a kapott szekvenciák megfelelőek voltak. A szekvencia analízis érdekes, részben nem várt eredményt adott (10. ábra). A 6 DGGE klón a *Desulfovibrio* – *Desulfomicrobium* nemzetségek közvetlen rokonsági körében helyezkedik el, ami megfelelt a specifikus primerek használata alapján feltételezett előzetes várakozásainknak. A szekvenciák azonban egy külön leszármazási vonalat alkotnak, melybe ezidáig még kizárólag tenyésztésbe nem vont klónszekvenciák tartoznak. Nem sikerült tehát kimutatnunk sem a tenyésztéssel izolált *Desulfovibrio alcoholivorans* fajt, sem más már leírt fajokat.



10. ábra: A DGGE optimalizálásához használt törzsek és a közösségi DGGE kivágott csíkjaiból nyert részleges 16S rDNS szekvenciák filogenetikai pozícióját bemutató neighbour-joining fa

(A törzsek, a DGGE csíkok, valamint a választott referencia fajok neveit a szekvenciák GenBank azonosító számai követik; a méretarány 10% nukleotid különbséget jelöl.)

Mindazonáltal szekvenciáink jól szemléltetik a DGGE felbontási képességeit, hisz egy mintán belül már öt nukleotid különbség esetén is (DH2-DH3) jól elkülönülő csíkokat kaptunk. Másrészt felhívja a figyelmet arra, hogy az azonos magasságban elhelyezkedő csíkok DNS-einek bázissorrendje nem feltétlenül egyezik meg egymással (DH1-DD1), mert a DNS szakaszok futtatással párhuzamos denaturációja során nemcsak a DNS szekvenciája, hanem annak G+C tartalma is meghatározó lehet.

A csíkokból nyert szekvenciák legközelebbi rokon klónszekvenciáit növényzettel borított talajból (AY289452), valamint nehézfém szennyezett környezetekből (AJ532715 és AJ581602) mutatták ki (Zhou és mtsai, 2003; Selenska-Pobell és mtsai, 2002). A szakirodalomból tudjuk, hogy a szulfátredukáló baktériumok mind a talajban (Daly és mtsai, 2000), mind nehézfémrel terhelte környezetekben előfordulnak, ahol többek között kiemelt jelentőségük lehetnek a nehézfém szennyezések eltávolításában (Tony és Parry, 2003, Vanbroekhoven és mtsai, 2007).

Az általunk azonosított szekvenciák a már leírt fajok közül az alkalofil *Desulfonatronum lacustre* fajjal (Pikuta és mtsai, 1998) mutatják a legnagyobb 16S rDNS hasonlóságot az adott szakaszon, minden esetben 84 és 88,0% között. Ez utóbbi faj képviselőjét először szintén egy szikes tó (a közép-ázsiai Khadyn) üledékében találták meg, ahol is az alkalofil baktériumközösség tagjaként, mint részlegesen oxidáló és elektron donorként hidrogént is elfogadó szulfátredukáló baktérium, a szerves anyagok anaerob lebontása során keletkező  $H_2$  eltávolításában vehet részt (Pikuta és mtsai, 1998).

A fenti szekvencia hasonlóság természetesen kismértékű ahhoz, hogy a velencei-tavi szekvenciákat bizonyosan ehhez a nemzetséghez tartozónak tekinthessük. Sőt még abban sem lehetünk biztosak, hogy a szekvenciák mögött szulfátredukáló baktériumok állnak, hiszen a delta-Proteobaktérium csoportnak számos nem szulfátredukáló nemzetsége is ismert. Ebből következően csak lehetséges, de nem bizonyítható, hogy a velencei-tavi egészséges és pusztuló nádasok rizoszférajából nyert szekvenciák egy új ágat képviselik a Gram-negatív szulfátredukáló baktériumoknak a delta-Proteobaktériumok körén belül. Mindezeket figyelembe véve az alkalmazott módszer segítségével tehát sajnos nem kaptunk egyértelmű eredményt a velencei-tavi egészséges és pusztuló nádasállományok rizoszférajában leggyakoribb szulfátredukáló csoportokkal kapcsolatban.

Tudomásunk szerint jelen munkánkat megelőzően, hasonló szulfátredukáló baktériumokra specifikus PCR és DGGE vizsgálatokat csak két alkalommal végeztek (Overmann és mtsai, 1999; Wieringa és mtsai, 2000). Az általuk alkalmazott primer párt (DSV687f – GC1055r) az akkori *Desulfovibrionaceae* családra specifikusan tervezték. A

primer pár használatával Overmann és mtsai (1999) mindössze néhány *Desulfovibrionaceae* rokon szekvenciát azonosítottak egy eutróf tó esetében, továbbá Wieringa és mtsai (2000) is csak egyetlen *Desulfomicrobium* szekvenciát találtak a DGGE csíkok között tengeri üledékek vizsgálata során. Ez utóbbi esetben a többi szekvenálással azonosított DGGE csík a *Geobacteraceae* családba tartozott a delta-Proteobaktériumokon belül. Miután így beigazolódott, hogy az említett munkákban használt primerek nemcsak a *Desulfovibrionaceae* családon belüli szekvenciákat szaporítják fel, feltételezhetjük, hogy a vizsgált mintákban az érintett szulfátredukáló csoportnál jóval nagyobb mennyiségben voltak jelen a *Geobacteraceae* család képviselői, és ez az arány jelentkezett a specifikus PCR-t követő DGGE analízis során is. Lehetséges tehát, hogy az általunk vizsgált rizoszféra környezetekben is hasonló helyzettel állunk szemben, azaz az alkalmazott primerek segítségével felszaporított delta-Proteobaktérium ág képviselői többségben voltak jelen a *Desulfovibrio* és *Desulfomicrobium* fajokkal szemben. A Daly és mtsai (2000) által tervezett primer pár esetében (DSV230f – DSV838r), amelyet mi is alkalmaztunk, a primerek esetleges keresztreakcióit széleskörűen vizsgálták *in silico* a nemzetközi szekvencia adatbázisokba feltöltött szekvenciák esetében. Mindazonáltal az akkor rendelkezésre álló szekvenciák nem tükrözhetők, de a ma rendelkezésre álló szekvenciák sem tükrözik a teljes mikrobiális diverzitást, aminek következtében különböző természetes környezetekben használva egyes csoport specifikusnak tekintett primerek specifikussága bővíülhet, ahogy azt az általunk kivágott DGGE csíkok szekvenciái is mutatják. Az ily módon előkerülő szekvenciák nagy része még tenyésztésbe nem vont, nem leírt, csak a szekvencia adatok alapján jelölt (ún. „candidate”) fajokhoz, sőt azon túlmenően sokszor egészen új filogenetikai ágakhoz tartozik, ami tovább nehezíti az eredmények értékelését. Esetünkben további nehézséget okozott, hogy a megfelelő GC-kapsos DGGE konstrukció előállításához 3 egymást követő PCR lépésre volt szükség, és azok közül a specifikus PCR primer párja több ponton is degenerált volt. Az egyes PCR reakciók ugyanis önmagukban is jelentősen torzíthatják a mintában meglévő természetes viszonyokat, amennyiben a primer és a célszekvenciák között akár csak egy nukleotid-bázis különbség is van (Sipos és mtsai, 2007), és ez méginkább igaz lehet degenerált primerek alkalmazása esetén.

Mindemellett említést érdemel, hogy a mi vizsgálataink óta már két esetben is sikeresen használták a Daly és munkatársai által leírt primer párokat specifikus PCR és DGGE együttes alkalmazása során. Dar és mtsai (2005) egy anaerob szennyvízkezelő reaktor szulfátredukáló baktérium közösségeit, Maukonen és mtsai (2006) pedig a papírgyártás közttermékeiben a *Desulfovibrionales* rendbe tartozó SRB előfordulását vizsgálta ezzel a



módszerrel. A *Desulfovibrio* – *Desulfomicrobium* csoportra specifikus primer pár alkalmazása során azonban a fenti szerzők is kénytelenek voltak a 16S rDNS-t általános bakteriális primerekkel elődúsítani és így módon 3 egymást követő PCR lépést használni. Vizsgálataink mindkét esetben változatos szulfátredukáló közösséget tártak fel, és csak néhány szekvencia esett a SRB körén kívülre. Mindazonáltal az eredmények összevetésénél figyelembe kell vennünk azt is, hogy a vizsgált mesterséges környezetek faji diverzitása jóval alulmarad egy természetes környezetéhez viszonyítva, és az előbbieket jóval nagyobb arányban tartalmazhatnak szulfátredukáló baktériumokat.

#### **7.4.2. SRB KIMUTATÁSA A KÖZÖSSÉGI DSRAB GÉN KÉSZLET KLÓNOZÁSÁVAL**

A rizoszféra szulfátredukáló baktérium közösségének tenyésztéstől független megismerésére a továbbiakban egy olyan módszert választottunk, melyben nem kellett egymást követő PCR lépéseket alkalmazni és a még le nem írt fajok esetében is biztonsággal kijelenthető, hogy azok a SRB közé tartoznak. A célunk a nádasok rizoszférájában jelen lévő és a korábban alkalmazott módszerekkel feltételezhetően csak kis mértékben megismert SRB minél teljesebb feltárása és azonosítása volt. Ezért vizsgálataink során már csak a Lángi-tisztás területén lévő egészséges nádasállomány rizoszférájára koncentráltuk.

Ehhez a 2004. júniusi mintavételt követően, a tenyésztéses vizsgálatokkal párhuzamosan, a rizoszférából közvetlenül izolált és felszaporított *dsrAB* szekvenciákból klónkönyvtárt hoztunk létre. A 90 klónszekvenciát a *dsr*-RFLP analízis eredményei alapján 9 különböző csoportra osztottuk. Az egyes *dsr*-RFLP csoportokba tartozó klónok számarányát és a csoportrepresentánsok szekvencia analízisének eredményét az 12. táblázat mutatja.

dsr-RFLP csoport (reprezentáns klón)	Klónok száma	Klónok %-os aránya	Legközelebbi rokon szekvencia a GenBank adatbázisban, azonosító szám, %-os hasonlóság		Hasonlóság egy tenyésztett törzsünkkel <sup>†</sup>	
			<i>dsr</i> -DNS	Dsr-protein*	<i>dsr</i> -DNS	Dsr-protein*
LVC-1	52	57,8%	<i>Desulfovibrio aminophilus</i> AY626029, 84,8%	<i>Desulfovibrio aminophilus</i> AY626029, 81,6%	-	-
LVC-2	17	18,9%	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF418187, 90,8%	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF418187, 92,0%	LVS-1, 99,0% (AM268425)	LVS-1, 99,5% (AM268425)
LVC-3	7	7,8%	<i>Desulfovibrio burkinensis</i> AF418187, 91,8%	<i>Desulfovibrio burkinensis</i> AF418187, 92,7%	LVS-26, 89,7% (AM268426)	LVS-26, 96,2% (AM268426)
LVC-4	5	5,6%	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> AF273034, 78,4%	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> AF273034, 81,2%	-	-
LVC-5	2	2,2%	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF418187, 73,2%	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF418187, 74,6%	-	-
LVC-6	3	3,3%	<i>Desulfohalobus elongatus</i> AF418202, 90,9%	<i>Desulfohalobus elongatus</i> AF418202, 89,5%	-	-
LVC-7	1	1,1%	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF418187, 73,5%	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF418187, 74,6%	-	-
LVC-8	2	2,2%	<i>Desulfohalobus propionicus</i> AF218452, 95,5%	<i>Desulfohalobus propionicus</i> AF218452, 94,8%	-	-
LVC-9	1	1,1%	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF418187, 74,1%	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> AF418187, 75,2%	-	-

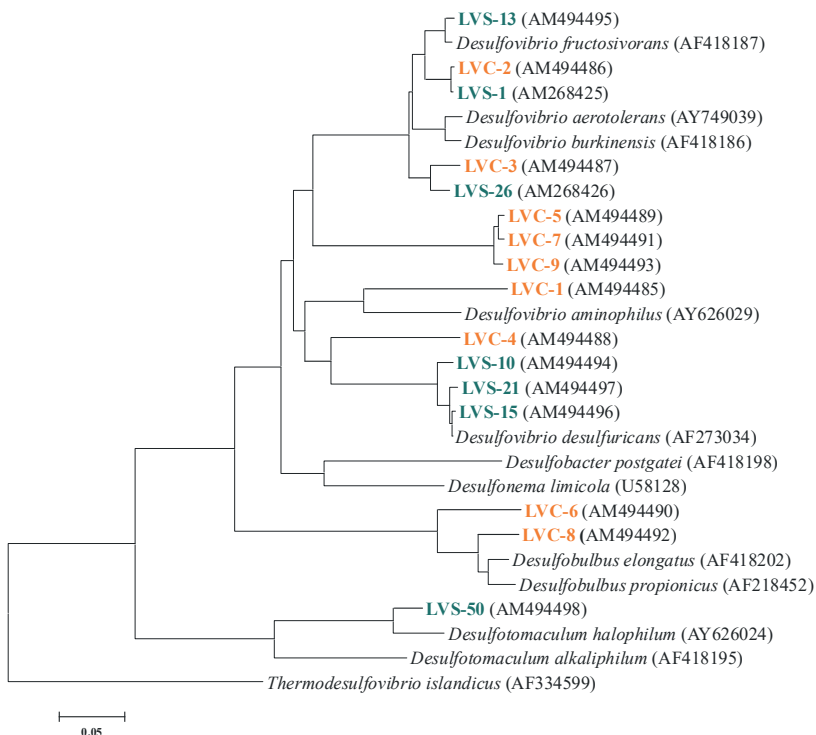
<sup>†</sup> Csak abban az esetben jelezve, amennyiben a hasonlóság nagyobb, mint a GenBank adatbázisnál kapott érték

\* A Dsr-protein szekvenciák a *dsr*-DNS szekvenciák lefordításából származnak (a standard kodon tábla lapján)

## 12. táblázat. A velencei-tavi Lángi-tisztás nádasállományának rizoszférajából származó *dsrAB* klónkönyvtár százalékos megoszlása és a reprezentáns klónok szekvencia analízisének eredményei

A reprezentatív klónok parciális *dsrAB* (*dsrA*) szekvencia szakaszait fehérje szekvenciákra fordítva (DsrA) és a közel rokon referencia szekvenciák (GenBank) bevonásával filogenetikai dendrogramot is szerkesztettünk (11. ábra). Ez utóbbi dendrogramon a közösségi *dsrAB* pool klónozásával nyert szekvenciákat együtt tüntettük fel az ugyanonnan izolált törzsek DsrA szekvenciáival. Ahogy a filogenetikai dendrogramon is látszik, a DsrA klónszekvenciák a fa két jól elkülönülő ágán csoportosulnak. Az első ágon a legnagyobb klóncsoportok találhatók LVC-1-től LVC-4-ig (az ide tartozó szekvenciák teszik ki a klónkönyvtár 90%-át, 12. táblázat) és három kisebb csoport az LVC-5, LVC-7 és LVC-9 (az összes klón 4%-a). A fenti csoportok összes megszekvenált képviselője a Desulfovibrionaceae családhoz tartozik, és azon belül a legnagyobb hasonlóságot *Desulfovibrio* fajokkal mutatja. A Desulfovibrionaceae család tagjainak hasonló dominanciáját már korábban is kimutatták tenyésztéstől független molekuláris biológiai módszerekkel mind tengeri (Hines és mtsai, 1999), mind édesvízi növények rizoszférajában (Acha és mtsai, 2005). Ahogy arra már korábban is utaltunk, a családba tartozó *Desulfovibrio* nemzetség tagjainak azon képessége, hogy tolerálni képesek időszakos, vagy akár hosszabb távú aerob viszonyokat, ideálissá teszi őket a rizoszféra környezetek benépesítésében. A legtöbb klónozással nyert szekvencia csak kis hasonlóságot mutat már leírt fajok *dsrA*, illetve

DsrA szekvenciáival (12. táblázat). Ez részben annak tulajdonítható, hogy klónszekvenciáink feltehetően részben a *Desulfovibriaceae* család még ez időig le nem írt fajaihoz tartoznak, részben viszont előfordulhat, hogy már leírt fajokhoz tartoznak ugyan, de azoknak még nincsen elérhető *dsr*, illetve Dsr szekvenciája olyan közösségi adatbázisokban, mint amilyen például a GenBank is. Azt, hogy a két lehetőség közül melyikkel állunk szemben, nem lehet meghatározni a legnagyobb és a negyedik legnagyobb klónsoportok esetében, ahol is a reprezentatív szekvenciák a *Desulfovibrio aminophilus*hoz (LVC-1, 81,6%-os parciális Dsr fehérje hasonlóság) és a *Desulfovibrio desulfuricans*hoz (LVC-4, 81,2%-os parciális Dsr fehérje hasonlóság) tartoznak alacsony hasonlósági értékekkel.



11. ábra. A velencei-tavi Lángi-tisztás nádasállományának rizoszférajából származó klónok és törzsek DsrA szekvenciáin alapuló neighbour-joining filogenetikai dendrogram (Az izolált törzsek nevei, mint LVS, a klónok nevei, mint LVC kezdődnek; a fajok, törzsek, illetve klónok neveit a hozzájuk tartozó szekvenciák GenBank azonosító számai követik; a méretarány 5% nukleotid különbséget jelöl.)

Mindazonáltal a tenyésztésből és a klónozásból származó eredmények összevetése során a második legnagyobb csoport (LVC-2) esetében bebizonyosodott, hogy a szekvencia egy már leírt fajhoz tartozik, de az érintett fajnak mindeztáig nem volt elérhető *dsr*, illetve Dsr szekvenciája az adatbázisokban. A filogenetikai dendrogramon (11. ábra) és a 12. táblázatban is látható, hogy az LVC-2 reprezentáns szekvenciája nagymértékű (99,5%-os) hasonlóságot mutatott egy ugyaninnen kitenyésztett törzsünk (LVS-1) DsrA szekvenciájával.

Az LVS-1 törzset korábban, mint *Desulfovibrio alcoholivorans* identifikáltuk megbízhatóan magas (99,0%-os) 16S rDNS hasonlósági szinten. Az összesített eredmények alapján a *Desulfovibrio alcoholivorans* fajjal rokon 16S rDNS és *dsr* szekvenciák a tenyésztett törzseink 23%-ához és a teljes klónkönyvtár 19%-ához voltak hozzárendelhetők. Egy korábbi munkánkban a *Desulfovibrio alcoholivorans* jelenlétét már sikerült igazolni a nád rizoszférajában tenyésztési módszerekkel (Borsodi és mtsai, 2003). Ugyancsak ez a faj volt a legtömegesebb izolátum egy ausztráliai mesterséges láp rizoszféra környezetében, ahol a domináns növényzetet *Eleocharis* és *Nympha* fajok alkották. Mindezek arra utalnak, hogy a *Desulfovibrio alcoholivorans* gyakori és tömeges képviselője lehet az édesvízi növények gyökérkörnyezetének, feltételezhetően specifikus anyagszere jellemzői és oxigén toleranciája révén. A fenti példához hasonlóan a harmadik legnagyobb klóncsoport (LVC-3; a klónok 8%-a) esetében is a legnagyobb szekvencia hasonlóságot egy tenyésztett törzsszel (LVS-26) kaptuk, ami szénforrás hasznosítási képességei révén feltehetőleg egy új faj képviselője lehet. Ez utóbbi szénhidrát hasznosító faj jelenléte a rizoszférajában szintén nem meglepő, hiszen a különböző cukrok, úgymint a fruktóz és a glükóz, a legnagyobb mennyiségben kibocsátott gyökér exudátumok közé tartoznak. A Desulfovibrionaceae körébe tartozó egyéb kisebb klóncsoportok (LVC-5, LVC-7 és LVC-9; együttesen a klónok kevesebb, mint 5%-a) egy külön vonalat reprezentálnak a családon belül, és esetükben nem találtunk nagyobb hasonlóságot egyik tenyésztett reprezentáns törzsünkkel sem (11. ábra).

A második filogenetikailag élesen elkülönülő DsrA csoport a Velencei-tó nádasainak rizoszférajában a *Desulfobulbus* nemzetséghez tartozott a nemrégiben leválasztott Desulfobulbaceae családon belül (Kuever és mtsai, 2005). A két idetartozó csoport (LVC-6 és LVC-8) a teljes klónkönyvtár 6%-át alkotja. A *Desulfobulbus* fajok, a *Desulfovibrio* fajokhoz hasonlóan, részlegesen oxidáló szulfátredukáló baktériumok, amelyek képesek oxidálni a propionsavat, és szulfát hiányában fermentálni a tejsavat és az etanolt. Képviselőiket gyakran izolálták tavak üledékéből (Widdel és Pfennig, 1982; Li és mtsai, 1999). A nemzetség tagjai szintén tömegesek és aktívak a természetes biofilmek anaerob és aerob régióiban egyaránt, ahol is aktivitásuk révén megfelelő környezetet (alacsonyabb

környezeti redox potenciált) biztosítanak más SRB számára (Santegoeds és mtsai, 1998). A torkolatvidéki sós mocsarakat gyakran benépesítő vízinövény, a *Spartina alterniflora* rizoszférájában azt is kimutatták, hogy az aerenchimán keresztül bejutó oxigén kifejezetten stimulálja a *Desulfobulbus* fajokat (Hines és mtsai, 1999), valamint hogy előfordulásuk jóval tömegesebb a rizoszférában, mint a növényzet nélküli üledékben (Devereux és mtsai, 1996). Mindezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a SRB között jelenlétük és aktivitásuk valószínűleg a rizoplánban a legjelentősebb, különösen a környezőnél magasabb oxigén koncentráció mellett újonnan kialakuló biofilmek esetében.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során arra kerestünk választ, hogy a Velencei-tó egészséges növekedést mutató, illetve pusztuló nádasállományainak rizoszféra környezetében a baktériumközösségek összetételét milyen – a szerves anyagok anaerob lebontásában anyagcsere kapcsolataik révén egymással összefüggő – fermentáló *Clostridium* és alapvetően respiratórikus anyagcseréjű szulfátredukáló baktériumfajok előfordulása jellemzi. A kérdés megválaszolásához nem törekedtünk a vizsgált baktériumközösségek esetleges szezonális változásainak feltárására, ezért a minták többségét a nádnövény vegetációs periódusának az elején, április vége és június eleje közötti időszakban vettük. Ez alól a 2002. októberi mintavétel jelentett kivételt, amikor is egy először általunk alkalmazott DGGE konstrukciót optimalizáltunk. A mintákban a *Clostridium*ok és a szulfátredukáló baktériumok mennyiségi viszonyait MPN módszer segítségével becsültük, ezt követően a rizoszféra mintákban előforduló anaerob baktériumok diverzitását részben tenyésztésen alapuló, részben molekuláris biológiai módszerek (DGGE, klónozás) segítségével igyekeztünk feltárni. Az alkalmazott módszerekkel tenyésztésbe vont törzsek, valamint a kivágott DGGE csíkok és a környezeti klónok identifikálásához 16S rDNS szekvencia analízist végeztünk.

Az MPN csíraszámbeccslés eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy egyik mintavételi időpontban sem mutatkozott szignifikáns különbség az egészséges és a pusztuló nádasállományokból származó minták esetében sem a *Clostridium*ok, sem az összes SRB vonatkozásában. Ugyanakkor valamennyi mintavételi időpontban mind a *Clostridium* endospórák, mind az összes SRB MPN értéke legalább egy nagyságrenddel nagyobbak adódtak a nád rizoszférájában, mint a környező vegetációtól mentes üledékben. A *Clostridium*ok és a szulfátredukáló baktériumok megemelkedett csíraszama a rizoszférában valószínűsíthetően az adott környezet nagyobb mennyiségű és változatosabb összetételű szénforrás és elektron donor tartalmának köszönhető, ami egyrészt a gyökér által kiválasztott anyagokból (az úgynevezett gyökér exudátumokból), másrészt a degradálódó növényi részekből származhat. Az elhalt és degradálódó növényi részekből felszabaduló szénhidrát polimerek és oligomerek a *Clostridium* fajok, a gyökér exudátumok szerves sav, kisebb mértékben aminosav, valamint cukortartalma pedig leginkább a szulfátredukáló baktériumok számára jelentenek jól hasznosítható szerves anyag kínálatot. A SRB előfordulására és gyakoriságára a *Clostridium*ok nagyobb száma is hatással lehet azért, hogy aktivitásuk révén a megemelkedett mennyiségű fermentációs végtermékek (legnagyobb részben egyszerű szerves savak és alkoholok) a szulfátredukáló szervezetek számára szintén többségében jól

hasznosítható szubsztrátumok lehetnek. Ilyen módon a szulfátredukáló baktériumok mennyiségi dinamikája összefüggést mutathat az adott közösség *Clostridium*ainak tömegességével. Eredményeinket mindazonáltal az alkalmazott tápközegek szelektivitása miatt fellépő hatások is befolyásolhatták. A SRB csíraszámának becslésére használt PMB tápleves ugyanis leginkább a *Desulfovibrio* és *Desulfotomaculum* nemzetségek fajainak dúsulását eredményezi, míg a *Clostridium*ok esetében alkalmazott RMAC tápközeg a fehérjék szénhidrátokhoz viszonyított magas aránya miatt valószínűleg erőteljesebben szelektál az ún. proteolitikus fajokra. Ezáltal valószínűleg mindkét tápleves alkalmazásával jelentősen alábecsülhettük az adott csoporthoz tartozó baktériumok természetben jelenlévő tényleges mennyiségét. Ugyanakkor az adott tápközegeken növekedni képes fajok esetében a nád rizoszfájában is sikerült igazolnunk a rizoszféra azon hatását, miszerint egy tömegesebb és feltételezhetően aktívabb mikrobaközösség számára biztosít megfelelő körülményeket.

A *Clostridium* fajok részletes vizsgálatát a 2000. júniusában vett rizoszféra minták tenyésztésen alapuló feldolgozásával végeztük el három különböző táptalaj felhasználásával. A kitenyésztett *Clostridium* törzsek döntő többségét *C. sporogenes*, *C. bifermentans*, *C. glycolicum*, *C. beijerinckii* és *Tissierella praeacuta* (korábban *C. hastiforme*) fajokként azonosítottuk. Kisebb számban, de előkerültek még a *C. botulinum* E típusához, a *C. carboxidivorans* és a *C. celerecrescens* fajokhoz közel álló izolátumok is. Két törzsünk a legnagyobb, de mindkét esetben 95,0% alatti szekvencia hasonlóságot a *C. acetobutylicum* és a *C. argentinense* fajokkal mutatta, de azoktól egyedi biokémiai jellemzőik alapján is elkülönültek. Ezeknek a tudomány számára feltételezhetően új fajoknak a leírása a jelen munka keretein belül elkezdődött, de még további vizsgálatokat igényel. Figyelemre méltó, hogy a velencei-tavi izolátumok között leggyakrabban identifikált *Clostridium* fajok közül többen is leírták már azok kisebb-nagyobb mértékű oxigén toleranciáját, ami nagymértékben segítheti ezeket a szervezeteket abban, hogy a gyökér oxigén transzportja miatt részlegesen aerob rizoszféra környezetek domináns tagjai legyenek. Bár a Velencei-tóból izolált és identifikált *Clostridium* fajok mindegyike előfordult mind az egészséges, mind a pusztuló nádasok rizoszféra környezetében, mégis az egyes mintavételi helyek között eltérést figyeltünk meg a különböző szénforrás hasznosító képességekkel jellemezhető fajok, illetve az egyes fajokon belüli különböző fenotípusos csoportok arányában. Ez részben azzal magyarázható, hogy a pusztuló nádasállományokban a gátolt fotoszintézis, az elzáródó szállítószövetek és az elhaló rizómák következtében nagymértékben csökken a gyökér által kiválasztott egyszerű cukrok mennyisége, ami az azok hasznosítására képes szervezetek

visszaszorulásához vezethet. Ezzel párhuzamosan megnőhet a keményítőbontó, a cellulolitikus, valamint a proteolitikus fajok aránya és aktivitása. A jellemzően proteolitikus fajokat (*Clostridium sporogenes*), vagy proteolitikus fenotípusos csoportokat (például a *Clostridium bifermentans* esetében) képviselő törzsek számarányának növekedése a velencei-tavi pusztuló nádasállomány rizoszféra mintájában is szembetűnő. Ugyanakkor az egészséges nádasállomány törzsei között jóval nagyobb arányban voltak jelen a sokféle egyszerű cukor bontására képes *Clostridium*ok. Az irodalmi adatok alapján cellulózbontásra képes *C. glycolicum* faj képviselői azonban közel egyenlő mértékben kerültek elő az egészséges és pusztuló rizoszférából, sőt a vizsgálataink során cellobiózt bontó fajok (ami nem jelenti egyértelműen a cellulóz bontásának képességét is) legnagyobbbrészt a velencei-tavi egészséges minta cellulóz tartalmú CM3 tápközeges dúsításából származtak. Mindebből arra következtethetünk, hogy a pusztuló nádas rizoszférájában a degradálódó növényi anyag cellulóz tartalmának lebontását feltehetően legnagyobb részben nem az anaerob *Clostridium* fajok végzik. Mindazonáltal eredményeinket óvatosan kell kezelnünk az alkalmazott tápközegek részben már említett szelektivitása miatt. Az RMAC tápközeghez hasonlóan, bár kisebb mértékben, de az RCM tápközegben is magasabb a fehérjék (pepton) aránya, így alkalmazásuk a tenyésztés során az ún. proteolitikus fajok dominanciája irányába torzíthatta a rizoszférában eredetileg fennálló viszonyokat. Mivel a *Clostridium*ok becsült csíraszama az általunk vizsgált egészséges és pusztuló nádasokban nem különbözött egymástól számottevően, és a közösségek szerkezetében megfigyelt eltérések sem utalnak kisebb, vagy nagyobb mértékű fitotoxikus zsírsavtermelésre, jelen vizsgálataink alapján a *Clostridium* közösségek szerkezete és aktivitása sokkal inkább a megváltozott körülményekhez és szénforrás-készlethez történő adaptációval, semmint a megfigyelt nádpusztulással hozható összefüggésbe.

A szulfátredukáló baktériumok vizsgálatát a 2002. és 2004. évi minták esetében tenyésztésen alapuló és attól független molekuláris biológiai módszereket alkalmazva végeztük. A tenyésztéses munkák során a 2002. júniusi minta feldolgozása mindössze egyetlen, *Desulfovibrio alcoholivorans*ként meghatározott szulfátredukáló baktériumfaj kimutatásához vezetett, aminek törzsei egyenlő mértékben oszlottak meg az egészséges és pusztuló rizoszféra minták között. Az ugyanezen év októberében végzett, a *Desulfovibrio* - *Desulfomicrobium* csoportba tartozó szulfátredukáló baktériumokra specifikus PCR és DGGE analízis során szintén nem mutatkozott különbség az egészséges és pusztuló rizoszféra faji struktúrájában. Az ekkor azonosított környezeti 16S rDNS szekvenciák kivétel nélkül egy még nem leírt filogenetikai ághoz tartoztak a többek között a *Desulfovibrio*, a



*Desulfomicrobium* és a *Desulfonatronum* nemzetségeket magába foglaló Desulfovibrionales rend közvetlen környezetében. A legközelebbi rokon fajjal (*Desulfonatronum lacustre*) mutatott alacsony 16S rDNS szekvencia hasonlóságok és a delta-Proteobaktériumokon belül elhelyezkedő szulfátredukáló csoportoktól való filogenetikai elkülönülésük miatt azonban nem lehetünk biztosak abban, hogy a feltárt szekvenciák egy új, ezidáig még nem tenyésztett szulfátredukáló ág képviselői lehetnek. Az azonban valószínűsíthető, hogy az ide tartozó baktériumok domináns képviselői a nád rizoszférájának, és mivel 16S rDNS-ük is célszekvenciája az általunk alkalmazott specifikus PCR primer párnak, feltételezhetjük, hogy a kevésbé domináns SRB szekvenciái azokkal szemben kiszelektálódtak az egymást követő PCR lépések során. Ez felhívja a figyelmet az alkalmazott primer pár alkalmazhatóságának korlátaira, főként a még sok korábban nem azonosított mikroorganizmust tartalmazó természetes környezetek (mint amilyen a nád rizoszféra) esetében. Mindemellett az először általunk optimalizált specifikus PCR – DGGE konstrukciót sikerrel alkalmazhatjuk más, a rizoszféránál kevésbé komplex (pl. mesterséges) környezetek esetében, vagy ahol a SRB dominanciája számottevőbb.

A 2002. évi vizsgálataink részbeni eredménytelensége okán és abból kiindulva, a 2004. évi mintavételhez kapcsolódóan változtattunk tenyésztési stratégiánkon (SRB izolálása az MPN hígítások legnagyobb még pozitív tagjaiból; a törzsek izolálást megelőző telepkepzése alacsonyabb agartartalmú táplemezek belsejében; nagyobb törzsgyűjtemény létrehozása). Ezzel párhuzamosan a SRB tenyésztéstől független vizsgálatához a szulfátredukáló baktériumokra specifikus disszimilatorikus szulfít reduktáz gén (*dsrAB*) környezeti mintából való felszaporítását (PCR) és a felszaporított szekvenciák klónozással történő szétválasztását alkalmaztuk. A fenti munka és időigényes módszereket a 2004. júniusi minta esetében csak az egészséges nádasállomány rizoszférájára koncentráltuk, az előforduló szulfátredukáló baktériumközösségek minél részletesebb megismerése érdekében. Mind a tenyésztéses, mind a molekuláris vizsgálatok eredménye a *Desulfovibrio* nemzetségbe tartozó SRB dominanciáját mutatta a nád rizoszférájában. A kitenyésztett törzsek között a *D. desulfuricans*, a *D. alcoholivorans* és a *D. fructosivorans* fajok képviselőit identifikáltuk. Két törzscsoportot részben az alacsony 16S rDNS hasonlóság, másrészt az elkülönülő anyagcsere tulajdonságok miatt nem sikerült faji szinten meghatározniuk. Az egyik a *Desulfovibrio aerotolerans*, a másik a *Desulfotomaculum halophilum* fajjal mutatta a legközelebbi rokonságot. Ezeknek a tudomány számára feltételezhetően új fajoknak a jellemzését megkezdttük, azonban új fajként történő leírásuk még további vizsgálatokat kíván. A klónozás révén a *Desulfovibrio* rokon szekvenciák mellett még a *Desulfobulbus* nemzetség körébe

tartozó fajok kerültek elő számottevő mennyiségben. Fontos eredményünk, hogy bár a klónozás során többnyire még nem leírt fajokhoz tartozó szekvenciákat detektáltunk, ám a klónozás szekvencia eredményeit a tenyésztéses vizsgálatok eredményeivel összevetve, a második legnagyobb klóncsoportot a tenyésztéssel is domináns *Desulfovibrio alcoholivorans*sal azonosíthattuk, amelynek először mi publikáltuk a *dsrAB* szekvenciáját, ami által a jövőben pontosabban azonosítható lesz ilyen módon is. A *Desulfovibrio* és a *Desulfobulbus* nemzetségekre egyaránt jellemző, hogy bizonyos mértékig tolerálni képesek a környezet oxigén tartalmát, ami az említett *Clostridium* fajokhoz hasonlóan segítheti elterjedésüket a rizoszférában. A kimutatott szulfátredukáló fajok, valamint izolált törzseink anyagsere aktivitásait figyelembe véve feltételezhetjük, hogy együttes előfordulásuk a nád rizoszférában részben azon alapulhat, hogy az adott környezetben fellelhető szénforrásokat hatékonyan képesek egymás között felosztani. A tenyésztéssel azonosított *Desulfovibrio* fajok ugyanis az általánosan hasznosított szénforrásokon túl képesek voltak egyszerű cukrok (*D. fructosivorans* és a feltételezhetően új *Desulfovibrio* faj), valamint különféle alkoholok, köztük a propanol, a butanol és propándiolok hasznosítására (*D. alcoholivorans*). Klónozással pedig sikerült kimutatnunk a propionsav oxidáló *Desulfobulbus* nemzetség tagjait. A felsorolt egyszerű szerves vegyületek részben a gyökérváladék alkotói, részben a korábbiakban megismert *Clostridium* fajok (és természetesen más fermentáló szervezetek) fermentációs végtermékei.

A gazdag szénforrás kínálat felosztása mellett természetesen a közös szénforrásokért (pl. a tejsavért és/vagy az etanolért) és a szulfátért folytatott versengés is befolyásolhatja a szulfátredukáló közösség összetételét és az egyes fajok arányát. Amint azt már az irodalmi áttekintésben is érintettük, az elektron donor (pl. tejsav és etanol), vagy elektron akceptor (szulfát) limitált környezetekben a részlegesen oxidáló SRB eredményesebbek a mindegyikük által felhasználható szénforrásokért folytatott küzdelemben, mint a teljesen oxidáló SRB. Munkám során a velencei-tavi nádasok rizoszférájából kizárólag ilyen részlegesen oxidáló szulfátredukáló baktériumokat mutattunk ki, amelyek a szénforrásokat csak acetáig tudják oxidálni és azt a továbbiakban nem képesek hasznosítani. Ez a tény arra utalhat, hogy a velencei-tavi nádasok rizoszférájában, az anaerob lebontási folyamatok végső lépéseként az acetátot feltehetőleg metanogén baktériumok oxidálják, és a SRB inkább az egyéb egyszerűbb szerves vegyületek, mint pl. a növények által kiválasztott anyagok és fermentációs végtermékek hasznosításában, és acetáig történő oxidációjában vesznek részt. A felvázolt ökológiai kapcsolatrendszerek meglétét azonban csak az érintett közösségek további és mélyreható vizsgálatával lehetne igazolni.

A SRB kimutatásához kapcsolódó tenyésztési és molekuláris biológiai alapú eredményeket összegezve elmondható, hogy mindkét módszer egybehangzóan kimutatta a *Desulfovibrio alcoholivorans* domináns jelenlétét és egy feltételezhetően új cukorhasznosító *Desulfovibrio* faj előfordulását a nád rizoszférájában. Mindazonáltal a legnagyobb klónosoporthoz tartozó szulfátredukáló fajt nem sikerült tenyésztésbe vonnunk, ahogy a *Desulfohalobacterium* nemzetséggel rokon klónszekvenciák képviselőit sem. Ez nem meglepő, hiszen mikrobiális ökológiával foglalkozó kutatók gyakran tapasztalják, hogy azok a fajok, amelyek direkt molekuláris módszerekkel vizsgálva tömegesen mutatkoznak az adott környezetben, csak kis részben vonhatók tenyésztésbe. A fajok dominancia viszonyait feszegetve azonban nem csak a tenyésztési korlátokat kell számba vennünk, hanem a molekuláris módszerekben jelentkező torzítások (pl. primer szelektivitás) lehetőségét is. A klónkönyvtárból előkerült és azonosított domináns szekvenciák alapján a tenyésztési eljárások továbbfejlesztésének lehetőségeit a Velencei-tó rizoszféra környezeteiben megtalálható SRB esetében a következőkben látjuk. Egyrészt célravezető lehet úgynevezett természetes tápközegek alkalmazása, amelyek sterilizált tóvizet és/vagy üledék pórusvizet tartalmaznak, ezáltal megfelelő körülményeket biztosítva a jelenlévő, de eddig tenyésztésbe nem vont fajok számára. Másrészt a tejsav, vagy a tejsavat is tartalmazó vegyes savas elegy használata mellett az egyes szénforrásokat külön-külön alkalmazva (pl. propionsavat a *Desulfohalobacterium* fajok szelektív kitenyésztésére) az egyes MPN sorozatokban, elősegítheti az egyes csoportok, illetve fajok elkülönítését. Mindezek mellett a klónkönyvtár domináns tagjainak az elvesztése a törzszolálás alapjául szolgáló MPN hígítási sorozatokban a rizoszféra minta nem megfelelő homogenizálásának következtében is előfordulhatott. Az esetünkben alkalmazott üveggyöngyös homogenizálás mellett ugyanis különböző, egyébként inert felületaktív szerek (pl. poliszorbátok) alkalmazása előmozdíthatja a gyökérfelszínre tapadó biofilmek és a gyökérhez szorosan kötődő baktériumok eltávolítását, és ily módon tenyésztésbe vonását.

## 9. KIVONAT

A munka során a Velencei-tó egészséges és pusztuló nádasállományának rizoszférajában élő *Clostridium* és szulfátredukáló baktériumfajok taxonómiai és anyagcsere diverzitásának, továbbá mennyiségi viszonyainak a megismerésére törekedtünk. A mintákban a baktériumok csíraszámát MPN módszer segítségével becsültük. A *Clostridium*ok diverzitását tenyésztésen alapuló, a szulfátredukáló baktériumokét a tenyésztés mellett molekuláris biológiai módszerek (DGGE, klónozás) segítségével is vizsgáltuk. A tenyésztésbe vont törzsek, valamint a kivágott DGGE csíkok identifikáláshoz 16S rDNS-, a szulfátredukáló klónok azonosításához pedig disszimilatórikus szulfit redukáz (Dsr) gén-, illetve fehérjeszekvencia analízist végeztünk.

Az MPN módszer alapján valamennyi mintavételi időpontban mind a *Clostridium* endospórák, mind az összes szulfátredukáló becsült csíraszama legalább egy nagyságrenddel nagyobbak adódott a nád rizoszférajában, mint a környező vegetációtól mentes üledékben. Mindkét csoport diverzitására általánosan jellemző volt a toxikus oxigén koncentrációkat jól toleráló fajok nagy aránya. Az identifikált *Clostridium* fajok összetételében nem, de a különböző szénforrás hasznosító képességekkel jellemezhető fajok arányában különbség mutatkozott az egészséges és a pusztuló nádasok rizoszféra között. A pusztuló nádasállományból izolált törzseinkre kisebb mértékben volt jellemző az egyszerű cukrok hasznosítása, de nagyobb arányban találtunk közöttük proteolitikus fajokat.

A Desulfovibrionales rendbe tartozó szulfátredukálóakra specifikus PCR és DGGE vizsgálatok alapján nem találtunk különbséget az egészséges és pusztuló rizoszféra faji struktúrájában. Az előkerült kisszámú környezeti 16S rDNS szekvencia ezidáig még nem leírt fajok szekvenciáihoz állt a legközelebb. Esetükben a szulfátredukálókhöz tartozás sem igazolható egyértelműen, ami az alkalmazott specifikus primerek korlátaira hívja fel a figyelmet. A tenyésztési stratégia fejlesztésével, és a közösségi Dsr génkészlet klónozásával részletesebb képet kaptunk a szulfátredukáló közösségekről. Mind a tenyésztéses, mind a molekuláris vizsgálatok eredménye a *Desulfovibrio* nemzetségbe tartozó szulfátredukálók dominanciáját mutatta a nád rizoszférajában. A különböző módszerek egybehangzóan a több különféle alkohol lebontására képes *Desulfovibrio alcoholivorans* domináns jelenlétére és egy feltételezhetően új cukorhasznosító *Desulfovibrio* faj előfordulására utaltak. Ezen túl mind a tenyésztés, mind a klónozás során előkerültek a másik módszerrel nem detektált fajok. A tenyésztett *Desulfovibrio* törzsek jellemezően specializált szénforrás hasznosító képességekkel rendelkeztek, és ez igaz a csak klónozással azonosított *Desulfovibrio*

nemzetség tagjaira is. A kizárólag tenyésztéssel azonosított *Desulfotomaculum* nemzetség tagjai az MPN alapján sem valószínű, hogy domináns tagjai a szulfátredukáló közösségnek.

Bár a legnagyobb klóncsoporthoz tartozó szulfátredukáló fajt nem sikerült tenyésztésbe vonnunk, a rizoszférából mégis több a tudományra nézve feltehetően új *Clostridium* és szulfátredukáló faj képviselőjét is sikerült kitenyésztenünk. Mindkét csoportnál döntően az adott rizoszféra környezet oxigén koncentráció viszonyaihoz és szénforrás ellátottságához adaptálódott fajokat identifikáltunk. A *Clostridium*ok esetében a pusztuló nádasok megváltozott körülményeihez történő fenotípusos alkalmazkodást is igazoltuk. Mivel a szulfátredukálók között tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független módszerekkel is csak részlegesen oxidáló, azaz ecetsavat nem hasznosító fajokat találtunk, valószínűsíthető, hogy a nádasok rizoszférájában a szerves anyagok végső anaerob lebontási szakaszában fontos szerep hárul a metanogén baktériumokra, azonban az elsődleges és másodlagos fermentációs végtermékek feltételezhetően jórészt szulfátredukció révén hasznosulnak.

## 10. ABSTRACT

The objective of the current work was to uncover the taxonomic and metabolic diversity as well as numeric correlations of *Clostridium* and sulphate-reducing bacteria living in the rhizosphere of healthy and declining reed stands of Lake Velencei. The CFU numbers of bacteria found in the samples were estimated with the MPN technique. The diversity of Clostridia was estimated by cultivation, sulphate-reducing bacteria were assessed beside cultivation by molecular biological techniques (DGGE, cloning). On the investigated strains and on the selected DGGE bands 16S rDNA analysis; on the sulphate reducing clones dissimilatory sulphite reductase (Dsr) gene- and protein-sequence analysis was carried out.

Based on the MPN method, the CFU values of *Clostridium* endospores and total sulphate reducing bacteria was at least one magnitude higher in the reed rhizosphere compared to the bulk sediment at all sampling time points. The diversity of both groups was generally characterised by the presence of species tolerating toxic oxygen concentrations. Even though a difference in the composition of *Clostridium* species was not discovered, however a greater diversity was uncovered regarding carbon-source utilisation patterns between the rhizosphere of healthy and declining reed stands. Strains from the declining stands were less characterised by the utilisation of simple sugars, on the other hand, a larger percentage was found to be proteolytic.

No differences in the taxonomic composition of the members of the Desulfovibrionales order from healthy and declining reed stand rhizosphere were detected based on group-specific PCR and DGGE investigations. The obtained environmental 16S rDNA sequences were found to be closest to the nucleotide sequences of undescribed species. In these cases, the fact of sulphate reduction could not be proven thus this draws attention to the possible limitations of the specific primers. A more detailed picture was obtained about the sulphate reducers by developing the cultivation technique and cloning the community *dsr* gene pool. Both the cultivation, both the molecular biological investigations displayed a dominance of the *Desulfovibrio* genus in the reed rhizosphere. All the different methods pointed to the dominance of the *Desulfovibrio alcoholivorans* – an alcohol utilising sulphate reducer – and to a presumably new, sugar utilising *Desulfovibrio* strain. Certain strains were either detected by the cultivation, or the cloning method. Cultivated strains of the *Desulfovibrio* genus were specialised carbon-source utilisers, which is also true for the members of the *Desulfobulbus* genus, identified by solely cloning. Members of the *Desulfotomaculum* genus are not likely to be dominant members of the sulphate-reducing bacterial community based on their MPN data.

Even though the members of the largest sulphate-reducing clone-group could not be cultivated, several presumably new members of the *Clostridium* genus and sulphate reducing bacteria could be isolated from the reed rhizosphere. In both groups, strains well adapted to the carbon source patterns and higher oxygen concentrations of the rhizosphere were cultivated. Further, phenotypic adaptation of *Clostridia* to the special environment of declining reed stand rhizomes was described. Since based on the cultivation-dependent and – independent methods, the presence of incomplete oxidiser strains of sulphate-reducing bacteria was described, it is likely that the anaerobic degradation of organic matter in the reed rhizosphere is characterised by the actions of metanogens, however, most of the primary and secondary fermentation products are utilised in the process of sulphate reduction.

## 11. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Acha, D., Iniguez, V., Roulet, M., Guimaraes, J. R., Luna, R., Alanoca, L., Sanchez, S. (2005) Sulfate-reducing bacteria in floating macrophyte rhizospheres from an amazonian floodplain lake in Bolivia and their association with Hg methylation. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7531-7535.
- Ács, É., Borsodi, A. K., Makk, J., Molnár, P., Mózes, A., Rusznyák, A., Reskóné, M. N., Kiss, K. T. (2003) Algological and bacteriological investigations on reed periphyton in Lake Velencei, Hungary. *Hydrobiologia* 506-509:549-557.
- Ács, É., Buczkó, K., Lakatos, Gy. (1994) Changes in the mosaic-like water surfaces of Lake Velencei as reflected by reed periphyton studies. *Studia Botan. Hung.* 25:5-19.
- Aeckersberg, F., Rainey, F. A., Widdel, F. (1998) Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. *Arch. Microbiol.* 170:361-369.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids. Res.* 25:3389-3402.
- Amann, R. I., Binder, B., Chisholm, S. W., Olsen, R., Devereux, R., Stahl, D. A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1919-1925.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
- Amann, R. I., Stromley, J., Devereux, R., Key, R., Stahl, D. A. (1992) Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:614-623.
- Andresen J. R., Bahl H., Gottschalk G., (1989) Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. In: *Clostridia*. Biotechnology handbooks 3. Minton, N. P., Clarke, D. J. (Eds.), Plenum Press, New York, pp. 27–62.
- Armstrong, J., Afreen-Zobayed, F., Armstrong, W. (1996b) *Phragmites* die back: sulfide- and acetic acid-induced bud and root death, lignifications, and blockages with the aerations and vascular systems. *New Phytol.* 134:601-614.
- Armstrong, J., Armstrong, W. (1999) *Phragmites* die-back: toxic effects of propionic, butyric and caproic acids in relation to pH. *New Phytol.* 142:201-218.

- Armstrong, J., Armstrong, W. (2001) An overview of the effects of phytotoxins on *Phragmites australis* in relation to die-back. *Aquat. Bot.* 69:251-268.
- Armstrong, J., Armstrong, W., Armstrong I. B., Pittaway, G. R. (1996c) Senescence and phytotoxin, insect, fungaland mechanical damage: factors reducing convective gas-flows in *Phragmites australis*. *Aquat. Bot.* 54:211-216.
- Armstrong, J., Armstrong, W., Van der Putten, W. H. (1996a) *Phragmites* die-back: bud and root death, blockages within the aeration and vascular systems and the possible role of phytotoxins. *New Phytol.* 133:399-414.
- Armstrong, W., Armstrong, J., Beckett, P. M. (1996) Pressurised ventilation in emergent macrophytes – the mechanism and mathematical modelling of humidity-induced convection. *Aquat. Bot.* 54:121-135.
- Bae, J-W., Park, J. R., Chang, Y-H., Rhee, S-K., Kim, B-C., Park, Y-H. (2004) *Clostridium hastiforme* is a later synonym of *Tissierella praeacuta*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:947-949.
- Bak, F., Pfennig, N. (1987) Chemolitotroph growth of *Desulfovibrio sulfodismutans* sp. nov. by disproportionation of inorganic sulfur compounds. *Arch. Microbiol.* 125:167-174.
- Bak, F., Pfennig, N. (1991) Sulfate-reducing bacteria in littoral sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85:43-52.
- Bayer, E. A., Shoham, Y., Lamed, R. (2000) Cellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. *In: The Prokaryotes* 3rd Edition. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), Springer, New York, pp. 578-617.
- Biebl, H., Spröer, C. (2002) Taxonomy of the glycerol fermenting clostridia and description of *Clostridium diolis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 25:491-497.
- Borbély, Gy., Máté, Cs., M-Hamvas, M., Grigorszky, I. (1998) Az eutrofizálódó vizekben megjelenő cianobaktériumok (kéalgák) toxintermelése és interakciója a felszíni vizekben előforduló növényekkel (a nád modell). *In: Salánki, J., Padisák, J. (Eds.), A Balaton kutatásának 1997-es eredményei.* Veszprém.
- Borsodi, A. K., Vladár, P., Cech, G., Gedeon, G., Beszteri, B., Micsinai, A., Reskóné, N. M., Márialigeti, K. (2003) Bacterial activities in the sediment of Lake Velencei, Hungary. *Hydrobiologia* 506-509:721-728.
- Boschker, H. T., de Graaf, W., Köster, M., Meyer-Reil, L., Cappenberg, T. E. (2001) Bacterial populations and processes involved in acetate and propionate consumption in anoxic brackish sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35:97-103.



- Breznak, J. A., Brune, A. (1994) Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu. Rev. Entomol.* 39:453-487.
- Brioukhanov, A. L., Thauer, R. K., Netrusov, A. I. (2002) Catalase and superoxide dismutase in the cells of strictly anaerobic microorganisms. *Microbiology.* 71:281-285.
- Brix, H. (1994) Functions of macrophytes in constructed wetlands. *Wat. Sci. Tech.* 29:71-78.
- Brix, H. (1997) Do macrophytes play a role in constructed wetlands? *Wat. Sci. Tech.* 35:11-17.
- Brix, H. (1999) Genetic diversity, ecophysiology and growth dynamics of reed (*Phragmites australis*). *Aquat. Bot.* 64:179-184.
- Brune, A., Frenzel, P., Cypionka, H. (2000) Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:691-710.
- Bryant, M. P., Campbell, L. L., Reddy, C. A., Crabill, M. R. (1977) Growth of *Desulfovibrio* in lactate and ethanol media low in sulfate in association with H<sub>2</sub>-utilizing methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1162-1169.
- Bryer, D. E., Rainey, A., Wiegel, J. (2000) Novel strains of *Moorella thermoacetica* form unusually heat resistant spores. *Arch. Microbiol.* 174:334-339.
- Brysch, K., Schneider, C., Fuchs, G., Widdel, F. (1987) Lithoautotrophic growth of sulfate-reducing bacteria, and description of *Desulfobacterium autotrophicum* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.* 148:264-274.
- Buckó, K., Schmidt, A. (1995) Szikes tavak. In: Pannon Enciklopédia, Magyarország Növényvilága, Járainé Komlódi M. (Ed.), Dunakanyar 2000 Kiadó, Budapest, pp. 74-76.
- Buczko, K., Ács, É. (1998) Comparison of succession of reed periphyton in a degraded and in an undisturbed part of a shallow lake (Lake Velencei, Hungary, Central Europe). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 26:1674-1676.
- Burke, D. J., Hamerlynck, E. P., Hahn, D. (2002) Interactions among plant species and microorganisms in salt marsh sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1157-1164.
- Castro, H. F., Williams, N. H., Ogram, A. (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31:1-9.
- Cato, E. P., Stackebrandt, E. (1989) Taxonomy and Phylogeny. In: Clostridia. Minton, N. P., Clarke, D.J. (Eds.), Plenum Press, New York, pp. 1-26.
- Chambers, R. M., Meyerson, L. A., Saltonstall, K. (1999) Expansion of *Phragmites australis* into tidal wetland of North America. *Aquat. Bot.* 64:261-273.

- Chang, Y. J., Peacock, A. D., Long, P. E., Stephen, J. R., McKinley, J. P., Macnaughton, S. J., Hussain, A. K., Saxton, A. M., White, D. C. (2001) Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3149-3160.
- Chartrain, M., Zeikus, J. G. (1986) Microbial ecophysiology of whey biomethanation: characterization of bacterial trophic populations and prevalent species in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:188-196.
- Cifuentes, A., Anton, J., de Wit, R., Rodriguez-Valera, F. (2003) Diversity of bacteria and archaea in sulphate-reducing enrichment cultures inoculated from serial dilution of *Zostera noltii* rhizosphere samples. *Environ. Microbiol.* 5:754-764.
- Cízková, H., Istvánovics, V., Bauer, V., Balázs, L. (2001) Low levels of reserve carbohydrates in reed (*Phragmites australis*) stand of Kis-Balaton, Hungary. *Aquat. Bot.* 69:209-216.
- Cízková, H., Strand, J. A., Lukavská, J. (1996) Factors associated with reed decline in a eutrophic fishpond, Rozmberk (South Bohemia, Czech Republic). *Folia Geobot. Phytotax.* 31:73-84.
- Clevering, O. A., Lissner, J. (1999) Taxonomy, chromosome numbers, clonal diversity and population dynamics of *Phragmites australis*. *Aquat. Bot.* 64:185-208.
- Cochran, W. G. (1950) Estimation of bacterial densities by means of the “most probable number”. *Biometrics* 6:105–116.
- Coleman, G. S. (1960) A sulfate-reducing bacterium from the sheep rumen. *J. Gen. Microbiol.* 22:423-436.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J. A. (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:812-826.
- Cord-Ruwisch, R., Kleinitz, W., Widdel, F. (1987) Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. *J. Petrol. Technol.* 1987, January: 97-106.
- Costerton, J. W., Lappin-Scott, H. M. (1995) Introduction to biofilms. *In: Microbial biofilms.* Lappin-Scott, H. M., Costerton, J. W. (Eds.) University Press, Cambridge, pp.1-14.
- Cowan, S. T., Steel, K. J. (1974) Manual for the identification of medical bacteria. University Press, Cambridge.
- Cypionka, H. (2000) Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:827-848.

- Cypionka, H., Widdel, F., Pfennig, N. (1985) Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31:39-45.
- Daly, K., Sharp, R. J., McCarthy, A. J. (2000) Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology* 146: 1693-1705.
- Dannenberg, S., Kroder, M., Dilling, W., Cypionka, H. (1992) Oxidation of H<sub>2</sub>, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O<sub>2</sub> or nitrate by sulphate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* 158:93-99.
- Dar, S. A., Kuenen, J. G., Muyzer, G. (2005) Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2325-2330.
- Dar, S. A., Yao, L., van Dongen, U., Kuenen, J. G., Muyzer, G. (2007) Analysis of diversity and activity of sulfate-reducing bacterial communities in sulfidogenic bioreactors using 16S rRNA and *dsrB* genes as molecular markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:594-604.
- Den Hartog, C., Kvet, J., Sukopp, H., (1989) Reed: a common species in decline. *Aquat. Bot.* 35:1-4.
- Denier van der Gon, H. A. C., van Breemen, N. (1993) Diffusion-controlled transport of methane from soil to atmosphere as mediated by rice plants. *Biogeochemistry* 21:177-190.
- Devereux, R., Mundfrom, G. W. (1994) A phylogenetic tree of 16S rRNA sequences from sulfate-reducing bacteria in a sandy marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3437-3439.
- Díez, B., Pedroós-Alió, C., Marsh, T. L., Massana, R. (2001) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2942-2951.
- Dilling, W., Cypionka, H. (1990) Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 71:123-128.
- Dillon, J. G., Fishbain, S., Miller, S. R., Bebout, B. M., Habicht, K. S., Webb, S. M., Stahl, D. A. (2007) High rates of sulfate reduction in a low-sulfate hot spring microbial mat are driven by a low level of diversity of sulfate-respiring microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 16:5218-5226.

- Dinka, M., Szeglet, P., Szabó, I. (1995) Hungarian Group Report. *In*: Van der Putten, W. H. (Ed.), Reed News Reports of EC Project EUREED (EV5V-CT92-0083), Vol. 3. Netherlands Institute of Ecology, Heteren, pp. 96-107.
- Doi, T., Hagiwara, Y., Abe, J., Morita, S. (2007) Analysis of rhizosphere bacteria of rice cultivated in Andosol lowland and upland fields using molecular biological methods. *Plant Root* 1: 66-74.
- Dolla, A., Fournier, M., Dermoun, Z. (2006) Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *J Biotechnol.* 126:87-100.
- Drasar, B. S., Roberts, A. K. (1990) Control of the large bowel microflora. *In*: Human microbial ecology. Hill, M. J., Marsh, P. (Eds.), CRC Press, pp 87-110.
- Dubilier, N., Mulders, C., Ferdelman, T., de Beer, D., Pernthaler, A., Klein, M., Wagner, M., Erseus, C., Thiermann, F., Krieger, J., Giere, O., Amann, R., (2001) Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm. *Nature* 411: 298-302.
- Elsden, S. R. Hilton, M. G., Waller, J. M., (1976) The end products of the metabolism of aromatic amino acids by clostridia. *Arch. Microbiol.* 107:283–288.
- Elsden, S. R., Hilton, M. G. (1979) Amino acid utilization patterns in clostridial taxonomy. *Arch. Microbiol.* 123:137-141.
- Elsden, S. R., Hilton, M. G., Parsley, K. R., Self, R. (1980) The lipid fatty acids of proteolytic clostridia. *J. Gen. Microbiol.* 118:115-123.
- Engloner, A. I., Kovács, M., Szabó, Sz. (2004) Differences between the element concentrations of reed organs and the substrate along water depth gradients in Lake Balaton, Hungary. *Acta Bot. Hung.* 46:287-301.
- Engloner, A. I., Papp, M. (2006) Vertical differences in *Phragmites australis* culm anatomy along a water depth gradient. *Aquat. Bot.* 85:137-146.
- Fischl, G., Berke, J. (1998) Új módszerek a nád minősítésében. *Hidrol. Közl.* 78:311.
- Fuchs, C. (1993) The beetle *Donacia claviceps* as a possible cause for the reed decline at Lake Constance (Untersee). *Limnol. Aktuell* 5:41-48.
- Garthright, W. E. (1998) Appendix 2. Most probable number from serial dilutions. *In*: FDA Bacteriological Analytical Manual 8th Edition. Rev. A. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Garthright, W. E., Blodgett, R. J. (2003) FDA's preferred MPN methods for standard, large or unusual tests, with a spreadsheet. *Food Microbiol.* 20:439-445.

- Gaston, L. W., Stadtman, E. R. (1963) Fermentation of ethylene glycol by *Clostridium glycolicum* sp. n. J. Bacteriol. 85:356–362.
- Gibson, G. R., Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. (1991) Growth and activities of sulphate-reducing bacteria in gut contents of healthy subjects and patients with ulcerative colitis. FEMS Microbiol. Ecol. 86:103-112.
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R. (1997) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol. 63:2802-2813.
- Gregory, E. M., Moore, W. E. C., Holdemann, L. V. (1978) Superoxide dismutase in anaerobes: survey. Appl. Environ. Microbiol. 35:988-991.
- Hakala, A., Sarmaja-Korjonen, K., Miettinen, A. (2004) The origin and evolution of Lake Vähä-Pitkusta, SW Finland – a multi proxy study of a meromictic lake. Hydrobiologia 527:85-97.
- Hammill, T. B., Crawford, R. L. (1996) Degradation of 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (dinoseb) by *Clostridium bifermentans* KMR-1. Appl. Environ. Microbiol. 62:1842-1846.
- Hedrick, D. B., White, D. C. (1986) Microbial respiratory quinones in the environment. J. Microbiol. Meth. 5:243-254.
- Helal, H. M., Sauerbeck, D. (1989) Carbon turnover in the rhiosphere. Z. Pflanzenenähr. Bodenk. 152:211-216.
- Hines, M. E., Evans, R. S., Sharak Genthner, B. R., Willis, S. G., Friedman, S., Rooney-Varga, J. N., Devereux, R. (1999) Molecular phylogenetic and biogeochemical studies of sulfate-reducing bacteria in the rhizosphere of *Spartina alterniflora*. Appl. Environ. Microbiol. 65:2209-2216.
- Hippe, H., Andreesen, J. R., Gottschalk, G. (1992): The genus *Clostridium* –Nonmedical. In: The Prokaryotes 2nd Edition. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. (Eds.), Springer, New York, pp. 1800-1866.
- Holmer, M., Jensen, H. S., Christensen, K. K., Wigand, C., Andersen, F. Ø. (1998) Sulfate reduction in lake sediments inhabited by the isoetid macrophytes *Littorella uniflora* and *Isoetes lacustris*. Aquat. Bot. 60:307-324.
- Holmer, M., Storkholm, P. (2001) Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: a review. Freshw. Biol. 46:431-451.
- Ionata, E., Canganella, F., Bianconi, G., Benno, Y., Sakamoto, M., Capasso, A., Rossi, M., La Cara, F. (2008) A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. pennavorans

- bv. nov., a thermotolerant organism isolated from solfataric muds. Microbiol. Res. 163:105-112.
- Ito, T., Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y. (2002) Successional development of sulfate-reducing bacterial populations and their activities in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 68:1392-1402.
- Janssen, P. H. (1991) Isolation of *Clostridium propionicum* strain 19acry 3 and further characteristics of the species. Arch. Microbiol. 155: 566-571.
- Johnson, K. A., Johnson, D. E. (1995) Methane emissions from cattle. J. Anim. Sci. 73:2483–2492.
- Jonkers, H. M., Koh, I. O., Behrend, P., Muyzer, G., de Beer, D. (2005) Aerobic organic carbon mineralization by sulfate-reducing bacteria in the oxygen-saturated photic zone of a hypersaline microbial mat. Microb. Ecol. 49:291-300.
- Jørgensen, B. B. (1982) Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulphate reduction. Nature 296:643-645.
- Jørgensen, B. B. (1987) Ecology of the sulphur cycle: oxidative pathways in sediments. In: The Nitrogen and Sulphur Cycles. Cole, A. J., Ferguson, S. (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 31-63.
- Karlsson, S., Bánhidí Z. G., Albertsson, A. (1988) Identification and characterization of alkali-tolerant clostridia isolated from biodegraded casein-containing building material. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28:305-310.
- Keis, S., Shaheen, R., Jones, D. T. (2001) Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:2095-2103.
- Kimura, B., Kawasaki, S., Nakano, H., Fujii, T. (2001) Rapid, quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified atmosphere-packaged fish. Appl. Environ. Microbiol. 67:206–216.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16:111–120.
- Klein, M., Friedrich, M., Roger, A. J., Hugenholtz, P., Fishbain, S., Abicht, H., Blackall, L. L., Stahl, D. A., Wagner, M. (2001) Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. J. Bacteriol. 183:6028-6035.

- Knoblauch, C., Sahm, K., Jørgensen, B. B. (1999) Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 49:1631-1643.
- Kovács, G. (2001) Klasszikus és molekuláris biodiverzitási vizsgálatok úszólápon növő keskenylevelű gyékény (*Typha angustifolia*, L.) rizoplán baktériumközösségén. Doktori értekezés, ELTE TTK, Mikrobiológiai Tanszék, Budapest.
- Kovács, M., Turcsányi, G., Tuba, Z., Wolcsánszky, S. E., Vásárhelyi, T., Dely-Draskovits, A., Tóth, S., Koltay, A., Kaszab, L., Szőke, P., Jankó, B. (1989) The decay of reed in Hungarian lakes. In: Salánki, J., Heródek, S. (Eds.), Conservation and Management of Lakes, Symp. Biol. Hung. 38, pp. 461-471.
- Kremer, D. R., Nienhuis-Kuiper, H. E., Hansen, T. A. (1988) Ethanol dissimilation in *Desulfovibrio*. Arch. Microbiol. 150:552-557.
- Kubin, P., Melzer, A. (1996) Does ammonium affect accumulation of starch in rhizomes of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud.? Folia Geobot. Phytotax. 31:99-109.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., Nei, M. (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Bioinformatics 12:1244-1245.
- Kühl, H., Koppitz, H., Rolletschek, H., Kohl, J.-G. (1999) Clone specific differences in a *Phragmites australis* stand. I. Morphology, genetics and site description. Aquat. Bot. 64:235-246.
- Küsel, K., Karnholz, A., Trinkwalter, T., Devereux, R., Acker, G., Drake, H. L. (2001) Physiological ecology of *Clostridium glycolicum* RD-1, an aerotolerant acetogen isolated from sea grass roots. Appl. Environ. Microbiol. 67:4734-4741.
- Küsel, K., Pinkart, H. C., Drake, H. L., Devereux, R. (1999) Acetogenic and sulfate-reducing bacteria inhabiting the rhizoplane and deep cortex cells of the sea grass *Halodule wrightii*. Appl. Environ. Microbiol. 65:5117-5123.
- Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (Eds.) Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, John Wiley & Sons, New York, pp 115-149.
- Langendijk, P. S., Kulik, E. M., Sandmeier, H., Meyer, J., van der Hoeven, J. S. (2001) Isolation of *Desulfomicrobium orale* sp. nov. and *Desulfovibrio* strain NY682, oral sulfate-reducing bacteria involved in human periodontal disease. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1035-1044.

- Leloup, J., Quillet, L., Berthe, T., Petit, F. (2006) Diversity of the *dsrAB* (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55:230-238.
- Liou, J. S., Balkwill, D. L., Drake, G. R., Tanner, R. S. (2005) *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:2085-2091.
- Loesche, W. J. (1969) Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 18:723-727.
- Lu, Y., Rosencrantz, D., Liesack, W., Conrad, R. (2006) Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 8:1351-1360.
- Lynch, J. M (1983) Soil biotechnology. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2000) Brock Biology of microorganisms 10th Edition. Prentice Hall, New Jersey, pp. 608-611.
- Mallet, C., Basset, M., Fonty, G., Desvillettes, C., Bourdier, G., Debroas, D. (2004) Microbial population dynamics in the sediments of an eutrophic lake (Aydat, France) and characterization of some heterotrophic bacterial isolates. *Microb. Ecol.* 48:66-77.
- Matthies, C., Kuhner, C. H., Acker, G., Drake, H. L. (2001) *Clostridium uliginosum* sp. nov., a novel acid-tolerant, anaerobic bacterium with connecting filaments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1119-1125.
- Maukonen, J., Saarela, M., Raaska, L. (2006) Desulfovibrionales-related bacteria in a paper mill environment as detected with molecular techniques and culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33:45-54.
- M-Hamvas, M., Máthé, C., Molnár, E., Vasas, G., Grigorszky, I., Borbély, Gy. (2003) Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L. seedlings. *Aquat. Toxicol.* 62:1-9.
- Micsinai, A., Borsodi, A. K., Csengeri, V., Horváth, A., Oravec, O., Nikolausz, M., Reskóné, M. N., Márialigeti, K. (2003) Rhizome-associated bacterial communities of healthy and declining reed stands in Lake Velencei, Hungary. *Hydrobiologia* 506-509:707-713.
- Miersch, J., Krauss, G.-J., Schlee, D. (1989) Allelochemische Wechselbeziehungen zwischen Pflanzen – eine kritische Wertung. *Wiss. Z. Univ. Halle* 38:59-74.



- Mogensen, G. L., Kjeldsen, K. U., Ingvorsen, K. (2005) *Desulfovibrio aerotolerans* sp. nov., an oxygen tolerant sulphate-reducing bacterium isolated from activated sludge. *Anaerobe* 11:339-349.
- Moura, I., Bursakov, S., Costa, C., Moura, G. J. J. (1997) Nitrate and nitrite utilization in Sulfate-Reducing Bacteria. *Anaerobe* 3:279-290.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., Wawer, C. (1997) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *In: Molecular microbial ecology manual*, vol. 3.4.4. Akkermans, A. D. L., van Elsas, J. D., de Bruijn, F. J. (Eds.), Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-27.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analyses of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Nakagawa, T., Nakagawa, S., Inagaki, F., Takai, K., Horikoshi, K. (2004) Phylogenetic diversity of sulfate-reducing prokaryotes in active deep-sea hydrothermal vent chimney structures. *FEMS Microbiol. Lett.* 232:145-152.
- Nazina, T. N., Rozanova, E. P., Kalininskaia, T. A. (1979) Fixation of molecular nitrogen by sulfate-reducing bacteria from petroleum strata. *Mikrobiologiya* 48:133-136.
- Nikolausz, M., Márialigeti, K., Kovács, G. (2004) Comparison of RNA- and DNA-based species diversity investigations in rhizoplane bacteriology with respect to chloroplast sequence exclusion. *J. Microbiol. Methods.* 56:365-373.
- Nisman, B. (1954) The Stickland reaction. *Bacteriol. Rev.* 18:16-42.
- Okabe, S., Ito, T., Sugita, K., Satoh, H. (2005) Succession of internal sulfur cycle and sulfide-oxidizing bacterial community in microaerophilic wastewater biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2520-2529.
- Olliver, B., Cord-Ruwisch, R., Hatchikian, E. C., Garcia, J. L. (1988) Characterization of *Desulfovibrio fructosovorans* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 149:447-450.
- Ostendorp, W. (1989) Die-back of reeds in Europe – a critical review of literature. *Aquat. Bot.* 35:5-26.
- Ouattara, S. A., Patel, B. K. C., Cayol, J. L., Cuzin, N., Traore, A. S., Garcia, J. L. (1999) Isolation and characterization of *Desulfovibrio burkinensis* sp. nov. from an African ricefield, and phylogeny of *Desulfovibrio alcoholivorans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:639-643.

- Overmann, J., Coolen, M. J. L., Tuschak, C. (1999) Specific detection of different phylogenetic groups of chemocline bacteria based on PCR and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene fragments. *Arch. Microbiol.* 172: 83-94.
- Overmann, J., van Gemerden, H. (2000) Microbial interactions involving sulfur bacteria: implications for the ecology and evolution of bacterial communities. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:591-599.
- Palop, M. L. L., Valles, S., Pinaga, F., Flors, A. (1989) Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium celerecrescens* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:68-71.
- Paucă-Comănescu, M., Clevering, O. A., Hanganu, J., Gridin, M. (1999) Phenotypic differences among ploidy levels of *Phragmites australis* growing in Romania. *Aquat. Bot.* 64:223-234.
- Plugmacher, S., Weigand, C., Beattie, K. A., Krause, E., Steinberg, C. E. W., Codd, G. A. (2001) Uptake, effects and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:846-852.
- Pikuta, E. V., Zhilina, T. N., Zavarzin, G. A., Kostrikina, N. A., Osipov, G. A., Rainey, F. A. (1998) *Desulfonatronum lacustre* gen. nov., sp. nov.: a new alkaliphilic sulfate-reducing bacterium utilizing ethanol. *Microbiology (English translation of Mikrobiologiya)* 67:123-131.
- Polyanskaya, L. M., Vedina, O. T., Lysak, L. V., Zvyagintsev, D. G. (2002) The growth-promoting effect of *Beijerinckia mobilis* and *Clostridium* sp. cultures on some agricultural crops. *Microbiology* 71:109-115.
- Postgate, J. R. (1984) *The Sulphate-Reducing Bacteria*. Cambridge University Press, London.
- Qatibi, A. I., Nivière, V., Garcia, J. L. (1991) *Desulfovibrio alcoholovorans* sp. nov., a sulfate reducing bacterium able to grow on glycerol, 1,2- and 1,3-propanediol. *Arch. Microbiol.* 155:143-148.
- Rabus, R., Hansen, T., Widdel, F. (2006) Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. *In: The Prokaryotes 3rd Edition*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), Springer, New York, pp. 659-768.
- Rainey, F. A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. (1996) The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of Nocardiopsaceae fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:1088-1092.

- Rea, N. (1996) Water levels and *Phragmites*: decline from lack of regeneration or die –back from shoot death. *Folia Geobot. Phytotax.* 31:85-90.
- Reskóné, M. (2005) A Velencei-tó vizében és üledékében élő baktériumközösségek mennyiségi viszonyainak és aktivitásának összehasonlító vizsgálata. Doktori értekezés, ELTE TTK, Biológia Doktori Iskola, Budapest.
- Reskóné, M. N., Borsodi, A. K. (2003) Long-term investigations on the changes of the MPN values of bacterial communities participating in the sulphur cycle in Lake Velencei, Hungary. *Hydrobiologia* 506-509:715-720.
- Reskóné, N. M. (1999) A Velencei-tó mai arcúlat, vízminősége. *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung.* 9:175-182.
- Reskóné, N. M., Ponyi, J., Szító, A., Kiss, G., Ács, É., Borsodi, A. (2001) A Velencei-tó biológiai állapota. *Hidr. Közl.* 81:448-451.
- Rooney-Varga, J. N., Devereux, R., Evans, R. S., Hines, M. E. (1997) Seasonal changes in the relative abundance of uncultivated sulfate-reducing bacteria in a salt marsh sediment and in the rhizosphere of *Spartina alterniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3895-3901.
- Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Salles, J. F., De Souza, F. A., Elsas, J. D. (2002) Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1595-1603.
- Santegoeds, C. M., Ferdelman, T. G., Muyzer, G., de Beer, D. (1998) Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3731-3739.
- Sass, H., Cypionka, H., Babenzien, H. D. (1997) Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22:31-39.
- Sass, H., Wieringa, E., Cypionka, H., Babenzien, H. D., Overmann, J. (1998) High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. *Arch. Microbiol.* 170:243-251.
- Selenska-Pobell, S., Flemming, K., Tzvetkova, T., Raff, J. (2002) Bacterial communities in uranium mining waste piles and their interactions with heavy metals. In: *Uranium in the aquatic environment*. Merkel, B. J. (Ed.), Springer, pp. 455-464.

- Shen, Y., Buick, R., Canfield, D. E. (2001) Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archaean era. *Nature* 410:77-81.
- Singh, B. K., Munro, S., Potts, J. M., Millard, P. (2007) Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Appl. Soil Ecol.* 36:147-155.
- Sipos, R., Székely, A. J., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K., Nikolausz, M. (2007) Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60:341-350.
- Smith, L. D. S. (1992) The genus *Clostridium* – medical. *In: The Prokaryotes* 2nd Edition. A. Ballows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K. H. (Eds.), Springer, New York, pp. 1867-1878.
- Song, Y., Liu, C., Finegold, S. M. (2004) Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6459–6465.
- Stackebrandt, E., Kramer, I., Swiderski, J., Hippe, H. (1999) Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24:253-258.
- Stackebrandt, E., Sproer, C., Rainey, F. A., Burghardt, J., Päuer, O., Hippe, H. (1997) Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1134-1139.
- Staley, J. T., Konopka, A. (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39:321-346.
- Strunk, O., Gross, O., Reichel, B., May, M., Hermann, S., Stuckmann, N., Nonhoff, B., Lenke, M., Ginhart, T., Vilbig, A., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K. H., Ludwig, W. (1998) ARB: A software environment for sequence data. Department of Microbiology, Technical University Munich, Munich (Germany).
- Stubner, S. (2004) Quantification of Gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR. *J. Microbiol. Methods.* 50:155-164.
- Stubner, S., Meuser, K. (2000) Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analyses. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34:73-80.
- Suen, J. C., Hatheway, C. L., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J. (1988) *Clostridium argentinense* sp. nov.: a genetically homogeneous group composed of all strains of

- Clostridium botulinum* toxin group G and some nontoxigenic strains previously identified as *Clostridium subterminale* or *Clostridium hastiforme*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:375-381.
- Sukopp, H., Markstein, B. (1989) Changes of the reed beds along the Berlin Havel. Aquat. Bot. 35:27-40.
- Taha, M. I., Mahmoud, S. A., Abdel-Nasser, M., Abdallah, A. R. (1977) Studies on the rhizosphere and rhizoplane microflora of common-bean and barley. Zentralbl. Bakteriell. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 132:345-349.
- Tauber, T., Berta, B., Székely, A. J., Gyarmati, I., Kékesi, K., Márialigeti, K., Tóth, E. M. (2007) Characterisation of community structure of bacteria in parallel mesophilic and thermophilic pilot scale anaerobe sludge digesters. Acta. Microbiol. Immunol. Hung. 54:47-55.
- Taylor, D. L., Herriott, I. C., Long, J., O'Neill, K. (2007) TOPO TA is A-OK: a test of phylogenetic bias in fungal environmental clone library construction. Environ. Microbiol. 9:1329-1334.
- Tonolla, M., Demarta, A., Peduzzi, S., Hahn, D., Peduzzi, R. (2000) In situ analysis of sulfate-reducing bacteria related to *Desulfocapsa thiozymogenes* in the chemocline of meromictic Lake Cadagno (Switzerland). Appl. Environ. Microbiol. 66:820-824.
- Tony, J., Parry, D. L. (2003) Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. Water. Res. 37:3379-3389.
- Van Dyke, M. I., McCarthy, A. J. (2002) Molecular biological detection and characterization of *Clostridium* populations in municipal landfill sites. Appl. Environ. Microbiol. 68:2049-2053.
- Van Glyswyk, N. O., van der Toorn, J. J. T. K. (1987) *Clostridium aerotolerans* sp. nov., a xylanolytic bacterium from corn stover and from the rumina of sheep fed corn stover. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:462-464.
- Vanbroekhoven, K., Van Roy, S., Gielen, C., Maesen, M., Ryngaert, A., Diels, L., Seuntjens, P. (2007) Microbial processes as key drivers for metal (im)mobilization along a redox gradient in the saturated zone. Environ. Pollut. 148:759-69.
- Varel, V. H., Fryda, S. J., Robinson, I. M. (1984) Cellulolytic bacteria from pig large intestine. Appl. Environ. Microbiol. 47:219-221.
- Villányi, I. (1996) Adatok a Kis-Balaton *Bacillus* és *Clostridium* közösségeiről. Szakdolgozat. ELTE TTK, Mikrobiológiai Tanszék, Budapest.

- Wagner, M., Roger, A. J., Flax, J. L., Brusseau, G. A., Stahl, D. A. (1998) Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J. Bacteriol.* 180:2975-2982.
- Walker, S. T., Bais, H. P., Grotewold, E., Vivanco, J. M. (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132:44-51.
- Widdel, F. (1992) The genus *Desulfotomaculum*. *In: The Prokaryotes* 2nd Edition. A. Ballows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K. H. (Eds.), Springer, New York, pp. 1792-1799.
- Widdel, F., Bak, F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. *In: The Prokaryotes* 2nd Edition. A. Ballows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K. H. (Eds.), Springer, New York, pp. 3352-3372.
- Widdel, F., Pfennig, N. (1977) A new anaerobic, sporing, acetate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum* (emend.) acetoxidans. *Arch. Microbiol.* 112: 119-122.
- Widmer, F., Fließbach, A., Laczkó, E., Schulze-Aurich, J., Zeyer, J. (2001) Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog<sup>TM</sup>-analyses. *Soil Biol. Biochem.* 33:1029-1036.
- Wiegel, J., Tanner, R., Rainey, F. A. (2006) An Introduction to the family Clostridiaceae. *In: The Prokaryotes* 3rd Edition Section 1.2. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), Springer, New York, pp. 654-678.
- Wieringa, E. B. A., Overmann, J., Cypionka, H. (2000) Detection of abundant sulphate-reducing bacteria in marine oxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach. *Environ. Microbiol.* 2: 417-427.
- Wind, T., Conrad, R. (1997) Localization of sulphate reduction in planted and unplanted rice field soil. *Biogeochemistry* 37:253-278.
- Wind, T., Stubner, S., Conrad, R. (1999) Sulfate-reducing bacteria in rice field soil and on rice roots. *Syst. Appl. Microbiol.* 22:269-279.
- Zamenhof, S., Eichhorn, H. H. (1967) Study of microbial evolution through loss of biosynthetic functions: Establishment of “defective” mutants. *Nature* 216:456-458.
- Zhou, J., Xia, B., Huang, H., Treves, D. S., Hauser, L. J., Mural, R. J., Palumbo, A. V. Tiedje, J. M. (2003) Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils. *Soil. Biol. Biochem.* 35:915-924.

## 12. FÜGGELÉK

A velenősejt-táji nádasok rizoszférájából kitenyésztett <i>Clostridium</i> törzsek morfológiai és biokémiai vizsgálatának eredményei																								
Fröngősejt csoport	Törzs	Önmag	Spórá	CAT	IND	URE	OLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	OEL	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE
A	AE2	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	
	AF6	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	
	AF9B	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	
	AE13	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	
	AE18	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	
	AF4	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	
	CE4A	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	
	CF8	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	
	P11	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	
	E13	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	
B	CF1	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	CF2	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	P12	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	CF9	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	E19	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	E22	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	AF2	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	AF3A	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	AF8	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	AF11A	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
C	AF12A	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	AF3B	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	CE3	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	CF10	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	E6	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	F3B	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	F29	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	F30	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	AF7	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	AF11B	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	CF11	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	P7	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	P7	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	CF2	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	P13	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	CF6	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	P15	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	AF5	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	AF16	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	CF1	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	P14	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	F26	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	CF4	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	CF12	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	E12	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	P4	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
	AF17	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	

Az egyes biokémiai tesztek rövidítéseinek magyarázatát lásd a jelmagyarázatban (3. oldal)  
 +, az adott testben pozitív, – az adott testben negatív reakcióra utal

A velencei távi nádasok vízszférájából kitenyészett Clostridium törzsek morfológiai és biokémiai vizsgálatának eredményei (folytatás)																								
Fermentációs csoport	Törzs	Orsó	Szón	CAT	IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ABA	GEL	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	PAF	SOR	RHA	TRE
D	AE3	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	E10	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	AE4	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	AE5	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	E11	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	E27	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	AE14	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
E	AE25	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	B9	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	AE21	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	PA6B	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	P25	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	CE2	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	P21	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
F	P16	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	P10	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	P23	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	P28	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	P44	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	AE6	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	E7	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
G	AE10	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	AE8	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	E23	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	E24	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	AE9	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	AE14	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
	AE15	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	P30	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	P20	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	P22	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B8	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	E20	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PA6B	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CF5	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I	CF7	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CE6	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	TP	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	AE11	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CF8	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CE12	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CF15	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
J	E16	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	E18A	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CE13	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CE7	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	E1	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	E15	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CE1	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K	CE10	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CF13	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CE5	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	E17	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Az egyes biokémiai tesztek rövidítéseinek magyarázatát lásd a jelmagyarázatban (3. oldal)  
+, az adott tesztben pozitív, – az adott tesztben negatív reakcióra utal



### ***13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS***

Szeretném mindenkinek megköszönni a segítségét, akinek része volt abban, hogy ez a dolgozat elkészülhetett.

Kiemelten köszönettel tartozom:

Dr. Borsodi Andreának, témavezetőmnek, a szakmai vezetésen, bátorításon és néhol ösztökélésen túl a kitartásáért és türelméért,

Dr. Márialigeti Károly tanszékvezető úrnak, hogy a Mikrobiológiai Tanszéken lehetővé tette számomra a munkám elvégzését és azt szakmailag is kísérve mindvégig támogatott,

Cech Gábornak és Vajna Balázsnak, akik szakdolgozóként kapcsolódtak be a munkába és nagyon sokat tettek annak előremozdítása érdekében,

Kovács Gábornak, aki sokszor eligazított a molekuláris mikrobiális vizsgálo módszerek rengetegében,

Rusznay Annának és Micsinai Adriennek, akiknek a segítségére mindig számíthattam,

Reskóné Nagy Máriának, a mintavételezésekben nyújtott segítségéért,

a Mikrobiológiai Tanszék mindenkori dolgozóinak, szakdolgozóinak és doktoranduszainak, akik számtalanszor nyújtottak segítő kezet,

munkatársaimnak a GlaxoSmithKline Biologicals Kft-nél, hogy mindenben támogatottak a dolgozat megírása alatt,

és végül, de nem utolsósorban köszönöm szüleimnek a nélkülözhetetlen támogatást és háttérrel, és hogy végig rendületlenül hittek a munkámban és bennem.